

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA

Tesi doctoral presentada per Na

ROSALINA GAVÍN MARÍN

amb el títol

**"Caracterización genética y fenotípica del flagelo
de *Aeromonas*"**

per a l'obtenció del títol de Doctora en Biología

Barcelona, 17 de gener de 2003.

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 El género <i>Aeromonas</i> , generalidades..... | 1 |
| 1.2 Mecanismos de patogenicidad del género..... | 2 |
| 1.3 El flagelo procariota..... | 17 |
| 2 MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 2.1 Cepas bacterianas..... | 29 |
| 2.2 Vectores utilizados..... | 31 |
| 2.3 Cebadores utilizados..... | 33 |
| 2.4 Medios de cultivo..... | 37 |
| 2.5 Obtención de lipopolisacárido..... | 39 |
| 2.6 Obtención de proteínas celulares totales..... | 39 |
| 2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida..... | 39 |
| 2.8 Purificación de flagelina y análisis de la secuencia N-terminal..... | 40 |
| 2.9 Obtención de anticuerpos..... | 40 |
| 2.10 Western blot de proteínas celulares..... | 41 |
| 2.11 Detección del grupo glicosil..... | 41 |
| 2.12 Cultivo de células HEP-2..... | 42 |
| 2.13 Ensayo de movilidad..... | 43 |
| 2.14 Microscopía electrónica..... | 43 |
| 2.15 Formación de biofilm <i>in vitro</i> | 43 |
| 2.16 Técnicas de genética molecular..... | 44 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | |
| Sección A: El locus <i>flm</i> en <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas | |
| 3.A.1 Resultados..... | 55 |
| 3.A.1.1 Obtención de mutantes por inserción de un miniTn5-Cm no adherentes de la cepa Sch3N de <i>A. caviae</i> | 55 |
| 3.A.1.2 Caracterización fenotípica de los mutantes..... | 55 |
| 3.A.1.3 Caracterización genética de los mutantes..... | 57 |
| 3.A.1.4 Clonaje del locus afectado por los mutantes..... | 59 |
| 3.A.1.5 Análisis del LPS por SDS-PAGE..... | 69 |
| 3.A.1.6 Complementación de los mutantes con los plásmidos pDI2211, pDI284 y pDI54..... | 70 |
| 3.A.1.7 Distribución de los genes <i>flmA</i> , <i>flmB</i> , <i>neuA</i> , <i>flmD</i> y <i>neuB</i> en <i>Aeromonas</i> mesófilas..... | 73 |
| 3.A.2 Discusión..... | 82 |
| Sección B: Caracterización del flagelo lateral de <i>Aeromonas</i> spp. | |
| 3.B.1 Resultados..... | 87 |
| 3.B.1.1 Caracterización de la flagelina lateral de <i>A. hydrophila</i> AH-3 y <i>A. caviae</i> Sch3N..... | 87 |
| 3.B.1.2 Caracterización del locus del flagelo lateral de <i>A. hydrophila</i> AH-3..... | 90 |
| 3.B.1.3 Caracterización del locus del flagelo lateral de <i>A. caviae</i> Sch3N..... | 109 |
| 3.B.1.4 Caracterización de los mutantes del locus <i>laf</i> de <i>A. hydrophila</i> AH-3 y <i>A. caviae</i> Sch3N..... | 118 |
| 3.B.1.5 Análisis de complementación de los mutantes..... | 124 |
| 3.B.1.6 Distribución de los genes <i>laf</i> en <i>Aeromonas</i> mesófilas..... | 127 |
| 3.B.2 Discusión..... | 129 |
| Sección C: Flagelo lateral en <i>Aeromonas</i> mesófilas | |
| 3.C.1 Resultados..... | 135 |
| 3.C.1.1 Distribución de las flagelinas laterales..... | 135 |
| 3.C.1.2 El locus <i>laf</i> completo en <i>Aeromonas</i> mesófilas..... | 140 |
| 3.C.1.3 Expresión en trans del locus <i>laf</i> de <i>A. hydrophila</i> | 141 |
| 3.C.2 Discusión..... | 144 |
| Sección D: Flagelo lateral en <i>Aeromonas salmonicida</i> | |

| | |
|---|-----|
| 3.D.1 Resultados..... | 147 |
| 3.D.1.1 Presencia y expresión de genes <i>laf</i> | 147 |
| 3.D.1.2 El locus <i>laf</i> completo en <i>Aeromonas salmonicida</i> | 149 |
| 3.D.1.3 Complementación de mutantes <i>laf</i> de <i>Aeromonas</i> mesófilas..... | 159 |
| 3.D.2 Discusión..... | 162 |
| 4CONCLUSIONES..... | 165 |
| 5 BIBLIOGRAFÍA..... | 167 |

1.1 El género *Aeromonas*, generalidades

El género *Aeromonas* está compuesto por bacilos Gram negativos, facultativamente anaeróbicos, oxidasa positivos y generalmente móviles por flagelación polar. Además son resistentes al agente vibriostático O/129 y no requieren NaCl para su crecimiento (Kirov, 1997).

Aunque el género fue clasificado originariamente en la familia *Vibrionaceae*, Colwell y col., (1986) sugirió que deberían clasificarse en una familia propia, *Aeromonadaceae*.

Aeromonas spp. son predominantemente patógenas para animales poiquilotermos, incluyendo anfibios, peces y reptiles (Carnahan y col., 1996). Sin embargo las aeromonas mesófilas están emergiendo como importantes patógenos humanos ya que se encuentran actualmente implicadas como agentes etiológicos en numerosos casos clínicos, afectando no sólo a pacientes inmunodeprimidos o de corta edad sino también a individuos inmunocompetentes (Altwegg y col., 1991; Hannien y col., 1995). Por otro lado, la especie psicrófila *A. salmonicida* es un importante patógeno de salmónidos, produciendo en los mismos la enfermedad conocida como furunculosis sistémica (Janda, 1991).

Las especies de *Aeromonas* son habitantes ubicuos de medios acuosos y causan una gran variedad de infecciones en humanos (Janda y Abbott, 1998), que incluyen septicemia (Janda y col., 1994), infecciones de heridas, meningitis (Lin y Cheng, 1998) y neumonía (Miyake y col., 2000), sin embargo están asociadas sobre todo a casos de gastroenteritis (Burke y col., 1984a; Thornley y col., 1997), aunque el papel de muchas cepas de *Aeromonas* aisladas de heces permanece en controversia por falta de un buen modelo animal (Thornley y col., 1997). Hasta la fecha se han aislado 14 especies fenotípicas aunque mediante pruebas de hibridación se han propuesto 15 grupos de hibridación (HGs). Algunas fenoespecies comprenden diferentes HGs y por su parte, los distintos HGs se distribuyen en diferentes especies fenotípicas (Carnahan y col., 1996). De las 14 fenoespecies *A. hydrophila* (HG1, HG3), *A. caviae* (HG4) y *A. veronii* bv. *sobria* (HG8/10) han sido las más comúnmente aisladas de infecciones en humanos, representando un 85% de los casos clínicos con *Aeromonas* como agente etiológico (Janda, 1991). *A. caviae*, en particular, es la especie más representativa en enteropatogenicidad pediátrica (Namdari y Bottone, 1990).

Se han descrito diferentes putativos determinantes patogénicos en *Aeromonas* spp., los cuales incluyen toxinas, adhesinas e invasinas que interactúan a diferente nivel para producir la enfermedad.

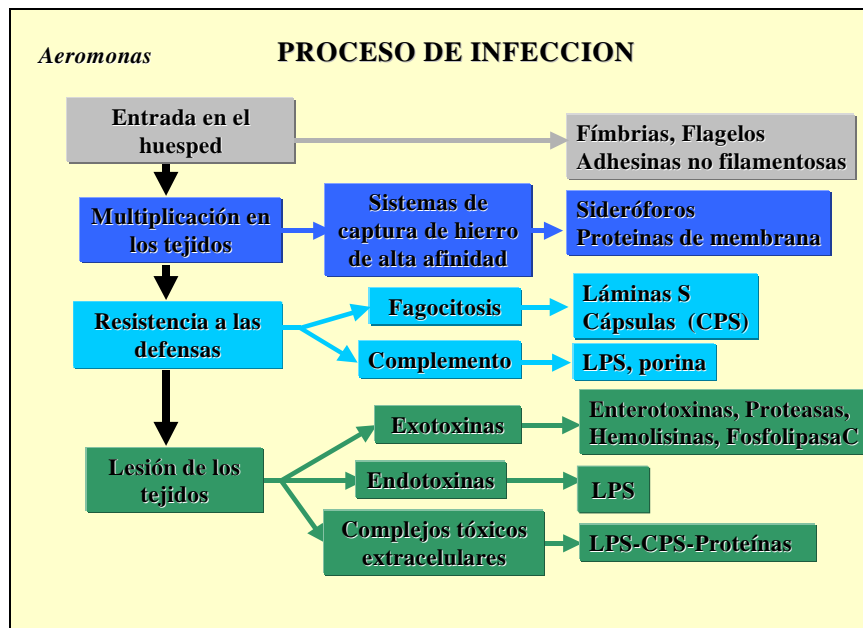


Figura 1.1 Esquema del proceso de infección de *Aeromonas* spp. con los principales determinantes patogénicos implicados.

1.2 Mecanismos de patogenicidad del género

1.2.1 Secreción de exotoxinas y/o enzimas hidrolíticas

Muchas cepas de *Aeromonas* secretan diversas enzimas extracelulares y/o toxinas con diferentes papeles en la patogenicidad. La mayoría de las proteínas secretadas al periplasma, membrana externa o extracelularmente poseen la clásica secuencia señal N-terminal necesaria para el sistema general de secreción (Pemberton y col., 1997).

1.2.1.1 Exotoxinas

No todas las cepas del género producen la totalidad de toxinas descritas hasta la fecha; además aunque ciertas cepas posean los genes que codifican para una toxina en concreto, éstos sólo se expresarán bajo determinadas condiciones de crecimiento. Algunas toxinas requieren una activación enzimática (Howard y Buckley, 1985).

1.2.1.1.1 Enterotoxinas

Se han descrito dos tipos diferentes de enterotoxinas en el género *Aeromonas*:

- a) Enterotoxinas citotóxicas que producen un importante daño al epitelio.

b) Enterotoxinas citotónicas, las cuales no producen degeneración del epitelio.

Enterotoxina citotóxica: o sus sinónimos aerolisina, citolisina, toxina Asao y β -hemolisina. Estas moléculas tóxicas poseen actividades hemolítica y citotóxica además de propiamente enterotóxica (Chopra y col., 1993). Sin embargo, también se han aislado de *Aeromonas* moléculas con actividad hemolítica o citotóxica únicamente (Chakraborty y col., 1984). Frecuentemente se identifica este factor en especímenes aislados de enfermos con diarrea.

Diferentes aerolisinas se han clonado y secuenciado a partir de distintas cepas de *Aeromonas*, incluyendo *A. hydrophila* (HG1, HG2, HG3) y *A. veronii* bv. *sobria* (HG8/10), ambas productoras de altos títulos de toxinas (Chakraborty y col., 1986; Chopra y col., 1993; Hirono y col., 1992; Howard y Buckley, 1986; Husslein y col., 1988). *A. caviae* (HG4) tiene tendencia a no producir enterotoxinas bajo las mismas condiciones, aunque alrededor del 50% de los aislados poseen el gen de la aerolisina (Husslein y col., 1992). Algunas cepas clínicas de *A. caviae*, bajo determinadas condiciones de cultivo, sí producen actividad citotóxica (Namdari y Bottone, 1991). Las diferentes aerolisinas muestran heterogenicidad respecto al tamaño (desde 49 a 65 kDa), la secuencia y la actividad citolítica.

La proteína se sintetiza en la célula como preproaerolisina con una clásica secuencia señal de 23 aminoácidos que se separa al atravesar la membrana citoplasmática. El producto, proaerolisina, continua siendo inactivo hasta que pierde 25 aminoácidos del extremo C-terminal; una vez ocurra esto, la proteína activa se unirá a su receptor en la membrana de los eritrocitos. La proaerolisina también tiene la capacidad de unirse, pero no puede oligomerizar, tal y como ocurre con la aerolisina, para formar canales de aproximadamente 1,5 nm en la membrana celular (Van der Goot y col., 1994).

Para añadir a la función biológica general de las aerolisinas, Ferguson y col., (1997) describieron la enterotoxina citotóxica Act de *A. hydrophila*, que recientemente ha sido implicada en el incremento del factor de necrosis tumoral (TNF)- α y en la producción de IL-1 β por los macrófagos o las células epiteliales intestinales (IEGC), capacidad que puede ser responsable de la patogenicidad que muestra el intestino delgado infectado con *Aeromonas* o con la proteína clonada (Chopra y Houston, 1999).

Las enterotoxinas citotónicas son homólogas a la toxina colérica (CT), a pesar de poseer diferentes pesos moleculares y reactividad variable frente a la antitoxina colérica. Pueden dividirse en dos tipos:

-Termolábiles (56°C durante 10 minutos), además de no presentar reactividad cruzada con la antitoxina colérica.

-Termoestables (100°C durante 30 minutos); reaccionan con la antitoxina colérica.

El mecanismo de acción de estas toxinas es similar a la CT, que eleva los niveles de AMPc y prostaglandinas (PgE₂) en células eucariotas, p.ej., las células CHO (de ovario de hámster chino) (Chopra y col., 1992; Chopra y col., 1996). Dicho efecto podría ser debido a que estas toxinas actuaran como adenosín difosfato (ADP)-ribosiltransferasa activando de esta manera la adenilato ciclase. Tanto el AMPc como la PgE₂ pueden estimular la adenilato ciclase intestinal causando una secreción fluida (Chopra y col., 1992). Otro efecto de estas toxinas es la elongación de las células CHO.

Se ha descrito un número variable de enterotoxinas citotónicas en *Aeromonas* spp. y algunas de ellas se han clonado y secuenciado (Chakraborty y col., 1990; Chopra y col., 1994; Chopra y Houston 1989; Ljungh y col., 1982; Potomski y col., 1987). Algunas de estas toxinas purificadas no muestran una sola banda sino dos o incluso tres de diferentes masas moleculares en geles de proteínas.

1.2.1.1.2 Hemolisinas

Además de la enterotoxina citotóxica con actividad β -hemolítica, las aeromonas producen otras β -hemolisinas que provocan la formación de agujeros en las membranas celulares dando lugar a lisis osmótica y destrucción completa de los eritrocitos. Sin embargo, no muestran homología génica con las aerolisinas descritas previamente. Las β -hemolisinas de *Aeromonas* son termolábiles (56°C durante 5 minutos), probablemente debido a la inactivación de alguna proteasa necesaria para su activación (Kirov, 1997).

El segundo tipo de hemolisinas del género son las α -hemolisinas que producen efectos citotóxicos reversibles y una lisis incompleta de los eritrocitos (Hirono y col., 1992).

1.2.1.2 Lipasas

Diferentes cepas de *Aeromonas* producen más de una enzima con actividad lipolítica, jugando algunos de ellos un importante papel en la patogénesis. Estas enzimas varían respecto a su peso molecular y/o su actividad. Las fosfolipasas (PLs) producidas por bacterias están envueltas en diferentes procesos patogénicos encontrándose a menudo asociadas con lesiones intestinales (Titball, 1993). Estas PLs pueden actuar como hemolisinas o como glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasas (GCATs). Dos GCATs de *A. hydrophila* y *A. salmonicida* respectivamente han sido clonadas y secuenciadas, además de haber sido descrita su implicación en el proceso patogénico

(Thornton y col., 1988; Eggset y col., 1994). Las propiedades de la GCAT de *A. hydrophila* son similares a las lecitin-colesterol aciltransferasas de mamíferos, funcionando como lipasa o fosfolipasa respectivamente, además de poder causar la lisis de los eritrocitos por digestión de su membrana plasmática (Thornton y col., 1988).

Un grupo de distintas lipasas de secreción con alta homología se ha descrito en *A. hydrophila*: PLA1, LipE, Lip, Apl-1 (Merino y col., 1999; Anguita y col., 1993; Chuang y col., 1997; Ingham y Pemberton, 1995). Aunque PLA1 muestra una alta similaridad con la enterotoxina citotónica termolábil, Alt, de *A. hydrophila* (Chopra y col., 1996), no es ni hemolítica, ni citotóxica, ni enterotóxica.

La fosfolipasa PLC de *A. hydrophila* es un importante factor de virulencia para *Aeromonas* spp. mesófilas (Merino y col., 1999). Esta PL tiene actividad lecitinasa y muestra homología con una hemolisina de *A. salmonicida* (Hirono y Aoki, 1993), aunque PLC sólo tiene una pequeña actividad hemolítica. Esta enzima es citotóxica pero no enterotóxica.

Además de la actividad hemolítica o citotóxica de algunas lipasas, éstas son también importantes para la nutrición bacteriana, y también actúan de factores de virulencia por su interacción con los leucocitos humanos o bien afectando diversas funciones del sistema inmunitario mediante los ácidos grasos libres generados a través de su actividad lipolítica (Kirov, 1997).

1.2.1.3 Proteasas

Al menos tres tipos de proteasas se han identificado en *Aeromonas* spp. que incluyen una serina proteasa termolábil y dos metaloproteasas, ambas termoestables pero EDTA sensible o insensible respectivamente (Ljungh y Wadstrom, 1983; Ellis, 1997).

Entre las dos mayores actividades proteolíticas extracelulares detectadas en *A. hydrophila*, se ha descrito y clonado una metaloproteasa termoestable de 38 kDa (Rivero y col., 1990) similar en peso molecular a la serina proteasa AspA producida por *A. salmonicida* (Whitby y col., 1992) y una serina proteasa termolábil de 68 kDa (Rivero y col., 1991). Ambas proteínas están presentes en muchos sobrenadantes de diferentes cultivos de *A. hydrophila* y las mismas cepas también muestran una actividad elastolítica, aunque ésta no ha sido atribuida a ninguna de las proteasas descritas. Cascón y col., (2000) han clonado y secuenciado recientemente la metaloproteasa AhpB, con un peso molecular de 38 kDa en estado maduro, que trabaja como elastasa y está considerada como factor de virulencia .

Cabe añadir que muchas aminopeptidasas pueden presentar diversas actividades específicas como la activación extracelular de la aerolisina, el recorte de la metionina N-terminal de nuevas cadenas peptídicas sintetizadas (metionina aminopeptidasas), y la estabilización de plásmidos multicopia ColE1 (aminopeptidasa A). Además, otras aminopeptidasas juegan un importante papel en el catabolismo de péptidos de origen exógeno (Pemberton y col., 1997).

En general las proteasas pueden contribuir a la patogenicidad causando lesiones directas del tejido, potenciando la invasión o mediante la activación proteolítica de toxinas (Kirov, 1997). Además también pueden contribuir en el establecimiento de la infección ayudando a traspasar las defensas del huésped y proporcionando nutrientes para la proliferación celular (Leung y Stevenson, 1988; Shieh, 1987).

1.2.1.4 Otras enzimas

En *Aeromonas* spp. se han detectado otras enzimas de secreción como amilasas, gelatinasas, nucleasas o quitinasas, pero se desconoce el papel de las mismas en la virulencia. Lo único que está claro es que contribuyen de manera significativa en la gran distribución y adaptabilidad a los cambios ambientales del género (Pemberton y col., 1997).

En cuanto a la terapia antimicrobiana, es importante tener en consideración que las aeromonas, p. ej., *A. hydrophila*, son importantes reservorios de genes codificantes de β -lactamasas (Rossolini y col., 1996).

1.2.2 Endotoxina (LPS)

El lipopolisacárido (LPS) está presente en todas las bacterias Gram negativas y consiste en un complejo glucolipídico localizado en la membrana externa. La única porción fosfolipídica, el lípido A, es una estructura altamente conservada y ligada de manera covalente al complejo polisacárido, compuesto de un núcleo, más conservado e interno en la estructura que el segundo componente, el antígeno O (Ag-O) el cual se extiende hacia el exterior celular y se compone de unidades oligosacarídicas repetidas que varían entre especies (Reeves y col., 1996).

El género *Aeromonas* se ha clasificado en 96 serogrupos, 44 basados en el antígeno O del LPS (Sakazaki y Shimada, 1984) y el resto en un nuevo esquema extendido por Thomas y col., (1990). Los serogrupos O:11, O:16 y O:34 tienen especial importancia en infecciones humanas (Janda y col., 1996).

Entre los pocos estudios genéticos sobre el LPS de *Aeromonas*, Zang y col., (2002) han descrito recientemente el análisis de dos grupos génicos del Ag-O,

clonándolos y secuenciándolos a partir de las cepas PPD134/91 y JCM3980 de *A. hydrophila*, ambas pertenecientes al serogrupo O:18. Ambos loci poseen 17 pautas abiertas de lectura (ORFs del inglés “open reading frame”) transcritas en la misma dirección y organizadas en tres clases de genes: genes que codifican para las enzimas responsables de las rutas biosintéticas de los azúcares, otros que codifican glicosiltransferasas y por último los genes que codifican las proteínas necesarias para procesar los oligosacáridos o polisacáridos respectivamente. Zang y col., (2002) también han estudiado la distribución del Ag-O de PPD134/91 entre varios serogrupos de *A. hydrophila*, encontrando que los diferentes serogrupos O de esta especie muestran algunos rasgos comunes en sus respectivos loci, además de que los serogrupos O:18 y O:34 son altamente parecidos. En el Ag-O de una cepa virulenta de *A. hydrophila* se ha detectado ramnosa y glucosamina, y muestra además una estructura idéntica al polisacárido O de *A. salmonicida* (Shaw y Squire, 1984). Sin embargo en *A. hydrophila* PPD134/91, las vías de síntesis de azúcares identificadas en su locus del Ag-O son para ramnosa y manosa respectivamente. La ramnosa es un componente presente en los polisacáridos de superficie de muchas bacterias encontrándose altamente conservada entre especies (Schnaitman y Klena, 1993).

Las propiedades virulentas del LPS de *Aeromonas* spp. son multifactoriales. Por un lado el lípido A, muy similar al de otras bacterias Gram negativas (Morrison, 1983), posee las características generales de endotoxina detectada en el lípido A del resto de bacterias. Éste actúa como mitógeno T independiente produciendo la activación policlonal de células B y una respuesta predominante de inmunoglobulinas M. Gudmundsdóttir y Gudmundsdóttir, (2001) han descrito que el LPS de *A. salmonicida* ssp. *achromogenes* (Asa) puede inducir la producción de citoquinas inflamatorias en ratones, *in vivo* e *in vitro*, y ejercer propiedades anérgicas y mitógenas. Además se han detectado una gran variedad de efectos tras la inyección en animales incluyendo pirogenicidad, leucopenia seguida de leucocitosis, shock séptico, necrosis hemorrágica de tumores, diarrea e incluso la muerte (Merino y col., 1995). Es importante puntualizar que cuando las bacterias Gram negativas conducen al shock séptico, la endotoxina (LPS) está clásicamente implicada como iniciador del proceso; y muchos estudios muestran la importancia de las citoquinas en la patogénesis (Damas y col., 1992).

Por otro lado, en diferentes trabajos se ha descrito la implicación del Ag-O del LPS de *Aeromonas* spp. mesófilas sobre la patogenicidad. Dicho Ag-O actúa como un prominente antígeno jugando diferentes papeles en la patogenicidad de muchas bacterias patógenas. En *Aeromonas* ejerce de adhesina (Francki y Chang, 1994; Merino y col., 1996a) y de factor de colonización (Merino y col., 1996b); lo que explica que algunas

especies de *Aeromonas* sean importantes patógenos primarios en gastroenteritis. Además, la secreción de algunas exotoxinas es dependiente de la presencia de Ag-O del LPS (Merino y col., 1992) y el mismo antígeno está implicado en la resistencia a la actividad bactericida del suero, aunque las cepas que lo poseen puedan activar el complemento, por lo que la resistencia será provocada probablemente porque la unión del componente C3b al Ag-O está lo suficientemente lejos de la membrana para excluir la formación del componente C5b-9, previniendo la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) (Merino y col., 1991). Alternativamente, polisacáridos purificados pueden absorber al azar algunas proteínas de complemento, provocando una caída de los niveles de la actividad bactericida mediada por complemento, y sugiriendo de este modo que el Ag-O del LPS de *Aeromonas* spp. debe de hacer de doble barrera, bloqueando la actividad bactericida asociada a complemento por dos vías distintas (Zang y col., 2002).

Es importante puntualizar que las cadenas de polisacárido de los LPS “smooth”, también llamado antígeno somático, al menos de los serogrupos O:13, O:33, O:34 y O:44, muestran un cambio fenotípico con importantes consecuencias para la expresión de determinantes de virulencia. Estas cepas expresan un LPS “smooth” (formas “smooth” (S) y “rough” (R), con y sin Ag-O respectivamente) cuando crecen a 20°C en medios con alta o baja osmolaridad y a 37°C sólo en medios con alta osmolaridad; sin embargo, expresan LPS “rough” (sólo la forma R del LPS) cuando crecen a 37°C en medios con baja osmolaridad (Merino y col., 1992; Aguilar y col., 1997; Merino y col., 1998). En infecciones humanas, este Ag-O es fuertemente expresado a las temperaturas del cuerpo humano cuando la osmolaridad incrementa a los valores normales presentes por ejemplo en el lumen del íleon, aunque éstos no se expresen en el medio de cultivo usual a 37°C (Mikuiskis y col., 1994). En *Aeromonas* mesófilas, el LPS con patrón “smooth” predomina entre los aislados clínicos (Tso y Dooley, 1995).

1.2.3 Lámina S

Matrices proteicas de dos dimensiones paracristalinas situadas en la superficie bacteriana, llamadas láminas S, son producidas por diferentes bacterias patógenas, aunque se desconoce su función en muchos casos (Messner y Sleytr, 1992). Las láminas S bacterianas hacen de interfase entre la célula y el medio, razón por la que actúan como barrera protegiendo a la célula. Además, debido a su posición juegan un importante papel en la interacción huésped-patógeno.

Las especies de *Aeromonas* mejor estudiadas que poseen lámina S son *A. salmonicida* (cuya lámina S es comúnmente conocida como lámina A) y *A. hydrophila*

(Dooley y Trust, 1988; Trust y col., 1980), aunque también se ha descrito la lámina S en *A. veronii* bv. *sobria* (Kokka y col., 1990). Ambas *Aeromonas* mesófilas que poseen lámina S pertenecen al serogrupo O:11 (Sakazaki y Shimada, 1984), serogrupo frecuentemente asociado con infecciones humanas (Kokka y col., 1990), aunque es posible que otras *Aeromonas* spp. mesófilas también la produzcan.

La lámina S de *Aeromonas* se compone de diversas subunidades de una proteína simple (como en la mayoría de bacterias) que se autoensamblan para formar un complejo tetragonal que envuelve a la célula por completo (Trust, 1993). La localización en superficie y el alto número de copias de las subunidades proteicas de la lámina S dan lugar a que dichas subunidades sean el mayor antígeno de superficie de aquellas bacterias que la poseen (Dooley y col., 1986).

Los genes estructurales de las láminas S de *A. salmonicida* (*vapA*) y *A. hydrophila* (*ahsA*) se han clonado y secuenciado (Belland y Trust, 1987; Thomas y Trust, 1995a); además de purificarse las proteínas codificadas por ellos mostrando una masa molecular del rango de 50-52 kDa (Trust, 1993). Ambas proteínas revelan un clásico péptido señal que será separado durante la translocación a través de la membrana citoplasmática. La secreción de las subunidades de lámina S requiere la acción de diferentes proteínas de secreción que muestran homología con los miembros del sistema general de secreción, aunque son específicas para las subunidades de la lámina S (Noonan y Trust, 1995a; Thomas y Trust, 1995b).

El complejo tetragonal de las láminas S producidas por *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* son similares morfológicamente a los de *A. salmonicida*, con subunidades proteicas que poseen dos dominios morfológicos, un dominio mayor conectado con el menor mediante un estrecho conector; cada unidad del complejo está formada por cuatro subunidades (Dooley y col., 1989; Kokka y col., 1990). Sin embargo, *A. salmonicida* parece ser diferente genéticamente a las dos aeromonas móviles, además las subunidades proteicas de *A. hydrophila* sufren modificaciones postraduccionales, probablemente fosforilaciones como otras subunidades de lámina S de otras *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* (Thomas y Trust, 1995a). Y también a diferencia de *A. salmonicida*, en la que la lámina S parece ser antigénicamente conservada, las proteínas de la lámina S de *Aeromonas* spp. mesófilas son antigénicamente diversas (Kostyuska y col., 1992).

Existen diferencias significativas entre el papel de la lámina S de *A. salmonicida* y *A. hydrophila* en la patogénesis de estas bacterias. Los complejos proteicos de superficie de *A. salmonicida* se muestran claramente como un importante factor de virulencia en

diversos estudios. Ishiguro y col., (1981) muestra en su trabajo que mutantes espontáneos de lámina S reducen dramáticamente la letalidad, resultados similares a los obtenidos al mutar mediante un elemento de transposición, Tn5, proteínas específicas de la lámina S o del sistema de secreción. A pesar de que la lámina S de *A. hydrophila* parece estar menos implicada en virulencia, Kokka y col., (1992) sugieren que esta estructura debe estar implicada en la diseminación sistémica tras la invasión a través de la mucosa gastrointestinal porque las láminas S poseen actividad antifagocitaria. Además, en *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* la presencia de lámina S incrementa la capacidad de adhesión y colonización de mucosas, y permite a la bacteria ser menos susceptible a la opsonofagocitosis (Merino y col., 1995).

Otros potenciales papeles *in vivo* de la lámina S de *Aeromonas* spp. serían proteger contra los efectos bactericidas del suero inmune y no inmune (Munn y col., 1982), o bien proteger de la proteólisis que podría ocurrir en los fagolisosomas (Chu y col., 1991; Kostrzynska y col., 1992). La lámina S de *A. salmonicida* también es importante en el proceso de colonización (Noonan y Trust, 1995b), facilitando la asociación con macrófagos (Trust y col., 1993), en la unión a diferentes proteínas de la matriz extracelular del huésped como colágeno de tipo IV, laminina, fibronectina, etc..(Trust y col., 1993; Doig y col., 1992) y también en la unión a inmunoglobulinas M y G de diferentes fuentes animales, todo ello a diferencia de la lámina S de *Aeromonas* mesófilas (Phipps y Kay, 1988).

Los estudios de la lámina A se han aplicado tanto a técnicas de diagnóstico mediante PCR e hibridación (Noonan y Trust, 1996; Hiney y col., 1992), como a la producción de vacunas atenuadas (Thonton y col., 1991). Además el serogrupo O:11 de *Aeromonas* se ha detectado en alimentos con un ensayo inmunoenzimático y utilizando anticuerpos policlonales contra la lámina S (Merino y col., 1993).

1.2.4 Fimbrias y otras adhesinas

Kirov, (1993) ha descrito la adhesión como un factor de virulencia esencial en las aeromonas que infectan a través de las mucosas o causan gastroenteritis. Entre las especies del género que presentan mayores valores de adhesión a cultivos de líneas celulares humanas o de otros mamíferos, *A. veronii* bv. *sobria* se ha descrito como la más adhesiva (Kirov, 1993) y más del 30% de los aislados clínicos de *A. caviae* son también adherentes (Namdari y Bottone, 1991; Neves y col., 1994). La especie menos eficiente a nivel de adhesión de entre las tres más frecuentes en infecciones humanas es *A. hydrophila* (HG1, HG2 y HG3).

Se han descrito dos clases de adhesinas en *Aeromonas* spp. mesófilas, las filamentosas (fimbrias o *pili*) y las no filamentosas.

1.2.4.1 Fimbrias filamentosas

Podemos dividir las fimbrias de *Aeromonas* spp. en diferentes tipos morfológicos. El tipo de estructura de superficie expresada y/o el número de estas estructuras por célula varía de acuerdo a la fuente de origen del aislado y a las condiciones de crecimiento (Kirov y col., 1995a). El crecimiento a bajas temperaturas ($5 > 20 > 37^{\circ}\text{C}$) y el medio líquido favorecen la expresión de fimbrias en la mayoría de cepas sea cual sea su origen, aunque no contamos con demasiada información respecto a los factores que influyen la expresión de fimbrias en *Aeromonas* spp. Los dos grandes grupos de fimbrias de *Aeromonas* son: fimbria corta y rígida (S/R del inglés “short/rigid”), las cuales se encuentran en alto número por célula, y fimbrias largas y flexibles (L/W del inglés “long/wavy”), encontrándose pocas por célula. Ambos tipos se encuentran tanto en aislados clínicos como del medio ambiente.

Las fimbrias S/R poseen epítomos comunes entre las diferentes especies analizadas y están altamente distribuidas, más del 95% de las cepas estudiadas poseen este tipo de fimbria. Es además el tipo expresado más predominante en las *Aeromonas* fuertemente fimbriadas como algunas cepas medioambientales de *A. veronii* bv. *sobria* (Kirov y col., 1995a). Estas fimbrias provocan autoagregación pero no hemoaglutinan ni se unen a células intestinales (Honma y Nakasone, 1990).

Las fimbrias L/W muestran un alto grado de homología entre los dominios aminoacídicos N-terminales de las secuencias de diferentes cepas. Además los análisis de las secuencias N-terminales indican que son *pili* de tipo IV, un importante factor de unión a células epiteliales de gran variedad de patógenos Gram negativos (Kirov y col., 1995a). Se trata de *pili* largos y finos (de 4 a 7 nm) que además actúan de hemoaglutininas; entre las hemoaglutininas de *Aeromonas* spp. algunas han sido asociadas a fimbrias y otras a proteínas de membrana externa (Burke y col., 1984b). Las fimbrias L/W son predominantes entre cepas aisladas de heces, en particular *A. veronii* bv. *sobria* (Kirov y col., 1995a), a pesar de ser pobremente fimbriadas (<10 *pili* por célula).

Es importante añadir que las aeromonas asociadas a gastroenteritis pueden expresar al menos dos familias distintas de *pili* de tipo IV (Barnett y Kirov, 1999). Entre los aislados fecales de *A. veronii* bv. *sobria* y *A. caviae* predomina la familia de *pili* Bfp (del inglés “bundle-forming pilus”) (Kirov y Sanderson, 1996; Kirov y col., 1999). La segunda familia ha sido descrita por Pepe y col., (1996), quienes han clonado el grupo de genes

de biogénesis del *pilus* de tipo IV *tap* de *A. hydrophila*. Esta segunda familia está ampliamente distribuida entre *Aeromonas* spp. y tiene homólogos en otras bacterias Gram negativas (Barnett y Kirov, 1999).

El *pili* Tap difiere del *pili* Bfp en su secuencia N-terminal además de en sus masas moleculares respectivas. Además, el *pili* Tap no es tan significativo en colonización intestinal como el Bfp que es una importante adhesina y factor de colonización tal y como muestran los estudios de purificación y adhesión de dicho *pili* a partir de *A. sobria* y *A. hydrophila* (HG1, HG2 y HG3). El *pili* aislado es capaz de adherirse a tejido intestinal humano y de bloquear la adhesión de la bacteria al mismo tejido (Hokama y col., 1990; Hokama e Iwanaga, 1992; Iwanaga y Hokama, 1992; Kirov y col., 1999), además las condiciones que muestran la máxima expresión de fimbrias son las mismas con los niveles óptimos de adhesión a líneas celulares. Cabe añadir que la destrucción de estas estructuras por medios mecánicos o bien enzimáticos provocan una reducción del 60 al 80% de la capacidad adhesiva de algunas cepas (Kirov y col., 1995b).

No todas las fimbrias de morfología flexible son *pili* de tipo IV; la secuencia aminoacídica de un aislado clínico de *A. hydrophila* muestra homología con la pilina Pap de tipo I de *E. coli* (Ho y col., 1990). La composición en aminoácidos de este nuevo polipéptido, también llamado mini pilina, no se ha encontrado en otras cepas de *Aeromonas*, y tampoco está claro su significado como factor de colonización.

1.2.4.2 Adhesinas no filamentosas

Se han descrito otras estructuras no filamentosas que actúan como adhesinas en *Aeromonas* spp. Entre estas estructuras la mayor adhesina es el monómero que constituye la lámina S (Atkinson y col., 1987), del cual previamente hemos indicado sus propiedades adhesivas. El complejo del lipopolisacárido, también descrito anteriormente, y algunas proteínas de membrana externa también se han visto implicados como adhesinas. Diversos trabajos han propuesto que las porinas de *A. hydrophila* actúan de adhesinas tipo lectina por la unión de dicha cepa a las superficies ricas en carbohidratos, como los eritrocitos y posiblemente el intestino humano (Kirov, 1993; Quinn y col., 1994).

1.2.5 Cápsula

La cápsula es un polisacárido extracelular que envuelve a la bacteria mientras permanece fijado a la misma y actuando de prominente antígeno, desempeñando importantes papeles en la patogenicidad de muchas bacterias patógenas.

El polisacárido capsular se ha encontrado en algunas especies del género *Aeromonas* cuando éstas crecen en medios ricos en glucosa o bien *in vivo*; las cepas en

cuestión son *A. hydrophila* AH-3 (serogupo O:34), PPD134/91 y JCM3980 (ambas del serogrupo O:18) (Martínez y col., 1995; Zhang y col., 2002), *A. veronii* bv. *sobria* AH-1 (serogrupo O:11) (Martínez y col., 1995) y algunas cepas de *A. salmonicida* (Garrote y col., 1992).

A pesar de que las aeromonas son capaces de activar el complemento, su polisacárido capsular tiene la capacidad de protegerlas frente a la actividad bactericida de dicho complemento (Merino y col., 1997b; Zhang y col., 2002) porque las cepas capsuladas inactivan el factor C3b depositado y como consecuencia reducen la opsonización impidiendo así la fagocitosis. Además, algunos trabajos muestran la importancia de la cápsula en la adhesión y la invasión a líneas celulares de peces (Merino y col., 1997a; Merino y col., 1996c).

Aguilar y col. (1999) describen dos genes capsulares de *A. hydrophila* O:34 (*orf1* y *wcaJ*) que confieren resistencia al suero a *E. coli* K-12, aunque en general la información genética con que contamos a cerca de la cápsula de *Aeromonas* spp. es muy poca. Recientemente Zhang y col., (2002) han descrito el locus génico de la síntesis de cápsula en la cepa PPD134/91, que puede ser dividido en tres regiones, al igual que el grupo II de los genes de cápsula de otras bacterias, incluida *E. coli* (Rigget y col., 1998) y que representan toda la información de los sistemas de ensamblaje de cápsula de las bacterias Gram negativas. Este locus consiste en 13 ORFs con una gran similitud a los genes que codifican, en otras bacterias, proteínas para la biosíntesis de la cápsula y para su transporte respectivamente.

1.2.6 Sideróforos

La competición por el hierro entre un huésped vertebrado y un microorganismo invasor es uno de los puntos donde se puede decidir el avance de una infección. Debido a la presencia de las proteínas de unión a hierro del huésped, p. ej., grupo hemo, transferrina, lactoferrina o ferritina, el hierro está poco accesible *in vivo*. En suero normal, las concentraciones de hierro libre están muy lejos de los mínimos requeridos para el crecimiento durante la infección de muchas bacterias (Weinberg, 1974). La actividad bacteriostática y bactericida del suero y las secreciones es debida a la capacidad termodinámica de la transferrina o la lactoferrina para secuestrar el hierro (Finkelstein y col., 1983) además de a la función del sistema de complemento, aunque un gran número de patógenos puede adquirir el hierro secuestrado en respuesta a la falta del nutriente. Las aeromonas, como otras bacterias patógenas, secretan sideróforos, ligandos específicos de Fe (III) de bajo peso molecular, para obtener sus suplementos de hierro, aunque algunos sideróforos pueden ser inactivados por diferentes componentes del

suero. Algunas aeromonas también adquieren el hierro *in vivo* por contacto directo entre proteínas secuestradoras de hierro del huésped y alguna proteína de unión de la bacteria (Stintzi y Raymond, 2000). Otro mecanismo alternativo para obtener hierro sin la intervención de sideróforos es el uso del grupo hemo como fuente de hierro, sobretodo en forma de hemoglobina. Este mecanismo requiere de la destrucción hemolítica de las células huésped para acceder al hierro en el grupo hemo. Previamente hemos indicado la importancia de las hemolisinas en la virulencia de *Aeromonas* spp.

Muchas cepas aisladas de *Aeromonas* mesófilas producen alguno de los dos sideróforos amonabactina o enterobactina respectivamente, este último descrito previamente en ciertas bacterias entéricas (Ozenberger y col., 1989); un número reducido de cepas no producen ningún sideróforo (Barghouthi y col., 1989; Zywno y col., 1989). La amonabactina es el sideróforo predominante en aislados identificados fenotípicamente como *A. hydrophila* y *A. caviae*, mientras que la enterobactina se encuentra únicamente en miembros de la fenospecie *A. sobria* (Barghouthi y col., 1989). No se ha identificado ningún aislado que produzca ambos tipos de sideróforos. Por otro lado, existe una correlación entre el grupo de hibridación de ADN (HG) y el tipo de sideróforo producido, lo que confiere una posible herramienta para la separación de algunas genopecies (especies separadas según su HG) del género y probablemente para la evaluación de su potencial virulencia (Zywno y col., 1992).

Los dos tipos de sideróforos de *Aeromonas* spp. están compuestos por grupos catecolato (fenolato) basados en el ácido 2,3-dihidroxibenzoico (2,3-DHB), que representa el centro para quelar el hierro, y aminoácidos aromáticos. La amonabactina se sintetiza en dos formas biológicamente activas, cada una de ellas compuesta por dos grupos catecol, lisina, glicina y triptófano (amonabactina T) o bien fenilalanina (amonabactina P) (Barghouthi, y col., 1989). La enterobactina por su parte es un triéster cíclico 2,3-dihidroxibenzoilserina (Ozenberg y col., 1989).

Los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos se componen de un segundo elemento además del sideróforo propiamente dicho, se trata del aparato asociado a la célula y responsable de procesar el sideróforo unido a hierro con la finalidad de entregar el metal al metabolismo bacteriano. Este sistema incluye un receptor unido a membrana específico para el sideróforo. Collighan y Coleman, (1995) han descrito y secuenciado el gen que codifica para un receptor de sideróforo de *A. salmonicida*, cuyo peso molecular es de 86 kDa. A pesar de esta información, conocer su función en profundidad requiere de un estudio más amplio. Otro receptor de sideróforos ha sido descrito por Stintzi y col., (2000) en *A. hydrophila*. Se trata de un receptor simple de amonabactina capaz de reconocer y transportar un extraordinariamente amplio rango

de sideróforos, con grupos quelantes tan variados como catecolato, hidroxamato o hidroxipiridonato. Además este receptor utiliza una nueva clase de mecanismo transportador de hierro en membrana, el mecanismo de lanzadera consistente en el intercambio de ligando. Este mecanismo para la adquisición de hierro otorga a la bacteria la habilidad de robar el hierro de sideróforos exógenos, proporcionando a *A. hydrophila* una gran ventaja *in vivo* ya que le ahorra el alto coste que significa la secreción propia de sideróforos, y proporciona además a la bacteria la habilidad de adquirir el hierro tan pronto lo encuentre (Stintzi y col., 2000).

Aunque no hay demasiada información a cerca de los genes de biosíntesis y utilización de sideróforos en aeromonas, el género posee al menos dos tipos distintos, pero relacionados funcionalmente y probablemente evolutivamente, de sistemas genéticos para la biosíntesis y activación del 2,3-DHB: sistema para la producción de amonabactina y de enterobactina respectivamente. Cada uno de estos sistemas es diferente pero a la vez similar funcionalmente al operón *entCEBA* de *E. coli* (Massad y col., 1994). Barghouthi y col., (1991) han descrito la secuencia del gen *amoA* de amonabactina, la primera enzima en la vía de síntesis del ácido corísmico a 2,3-DHB, que muestra únicamente un 58% de identidad con su homólogo en *E. coli*, *entC*, aunque la secuencia deducida en aminoácidos muestra un 79% de similaridad en su extremo C-terminal con la proteína EntC. Ambos operones, para la amonabactina y enterobactina respectivamente, están precedidos por una secuencia parecida al sitio de unión de la proteína represora Fur, que controlaría la expresión de los genes.

Massad y col., (1991) han presentado evidencias que sugieren que entre los dos tipos de sideróforos de *Aeromonas* spp., las cepas productoras de amonabactina pueden usar el hierro unido a la transferrina del huésped, mientras que la enterobactina no es funcional en suero porque la albúmina se une a este tipo de sideróforo (Konopa y Neilands, 1984). Además, Stintzi y Raymond, (2000) muestran que la amonabactina no es sólo capaz de robar hierro a la transferrina sino también a la lactoferrina, probando este papel esencial de la amonabactina sobre la adquisición de hierro y por lo tanto en el establecimiento de la patogénesis.

1.2.7 Flagelo y movilidad

Aeromonas spp. son normalmente móviles mediante un flagelo polar monotrico y sin vaina responsable de la natación en medio líquido. A pesar de que la especie psicrófila *A. salmonicida* ha sido definida dentro del género como no flagelada y no móvil, algunos estudios sugieren que algunas cepas de *A. salmonicida* expresan con baja frecuencia un flagelo polar sin vaina (Umelo y Trust, 1997). McIntoch y Austin, (1991) han

descrito que la incubación de *A. salmonicida* a temperaturas supraóptimas (de 30 a 37°C) y en medio líquido con alta viscosidad resulta en la generación de movilidad por la expresión de flagelación polar en un 1% de las células observadas.

Ciertas cepas de *Aeromonas* son capaces de producir muchos flagelos laterales peritricos cuando se cultivan sobre superficies sólidas (Shimada y col., 1985), pero sólo el 50-60% de las especies comúnmente aisladas de diarreas de *Aeromonas* mesófilas son capaces de expresar este segundo tipo de flagelo, que además es también sin vaina y se necesita para la movilidad mediante “swarming” de *Aeromonas* (Kirov y col., 2002).

La producción de flagelo comprende la expresión de más de 50 genes y es además muy costosa en términos de recursos y energía para las bacterias (Macnab, 1996), por lo tanto es ventajoso para la célula poder sintetizar el flagelo sólo cuando lo necesita. Además, el poseer dos sistemas flagelares distintos, polar y lateral, es poco común relativamente.

Rabaan y col., (2001) han purificado la flagelina polar de *A. caviae* que muestra una masa molecular en geles SDS-PAGE mayor a la estimada a partir de la secuencia en aminoácidos, aberración que podría deberse a modificaciones postraduccionales de las flagelinas, como glicosilación, que se están describiendo cada vez en más bacterias.

Cuatro bacteriófagos con el flagelo como receptor primario se han aislado y caracterizado a partir de *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* (Merino y col., 1990; Rubires y col., 1998). Todos estos fagos son capaces de replicar en diferentes *Aeromonas* mesófilas independientemente de la especie o del serogrupo O y ninguna cepa es capaz de comportarse como huésped de dos de estos bacteriófagos a la vez. Además, *A. salmonicida*, diferentes especies de *Vibrio* o más de 40 *Enterobacteriaceae* estudiadas son resistentes al ataque de estos fagos. En conclusión, los cuatro bacteriófagos podrían ser de utilidad para comenzar un fagotipaje del género según su antígeno H (el flagelo).

En dos trabajos distintos se han clonado, secuenciado y caracterizado los *loci* de las flagelinas polares de *A. salmonicida* (Umelo y Trust, 1997) y *A. caviae* (Rabaan y col., 2001) respectivamente. Ambos poseen dos genes de flagelina en paralelo (*flaA* y *flaB*) además de otros genes flagelares. Los genes que codifican para la flagelina descritos muestran alta homología entre sí, propiedad intrínseca de los genes de flagelina.

La movilidad así como la presencia de flagelo están relacionados con diferentes aspectos de la patogenicidad, predominantemente adhesión e invasión de células eucariotas. Diferentes trabajos indican que la movilidad y el flagelo polar se necesitan para la adhesión, el paso previo a la colonización, y para la invasión de líneas celulares de peces y humanas (Merino y col., 1997c; Thornley y col., 1997; Rabaan y col., 2001)

porque mutantes no flagelados, flagelos eliminados mecánicamente o la aglutinación de éstos con anticuerpos anti-flagelina reducen tanto la adhesión como la habilidad de invasión. Podríamos por lo tanto incluir el flagelo en el apartado de adhesinas filamentosas descrito previamente.

El flagelo, tanto polar como lateral, es el objeto de estudio de este trabajo.

1.3 El flagelo procariota

1.3.1 Movilidad mediante flagelación

No sólo el flagelo proporciona a las bacterias la capacidad de desplazarse en el medio, aunque sí es el responsable en la mayoría de casos. Se pueden además diferenciar dos tipos de movilidad generadas por dicho apéndice:

-“Swimming” o natación, ya sea con flagelos externos o axiales (endoflagelos).

-“Swarming” o enjambrado.

Natación

Es el desplazamiento de las bacterias de forma individual y al azar en medios líquidos o viscosos en el caso de especies cuyo flagelo se localiza de manera axial, como es en las espiroquetas y bacterias helicoidales. En el primer caso el movimiento es originado por rotación flagelar, mientras que el segundo es debido a movimientos de flexión y giro.

Cabe añadir que el número y disposición de los flagelos varía en las distintas especies bacterianas, pudiendo encontrarse un único apéndice en posición polar o subpolar (bacterias monotricas) anclado, por lo tanto, en un extremo celular, o bien un número variable de éstos, dando lugar según su disposición, a las bacterias: lofotricas, que tienen dos o más flagelos en un extremo celular; anfitricas, con un mínimo de un flagelo en cada polo; peritricas (o con flagelación lateral) con diversos flagelos distribuidos alrededor de la superficie celular, típicamente de 6 a 8 en el caso de las bien conocidas *Escherichia coli* y *Salmonella*; y por último periplasmática, como es el caso de los endoflagelos, que además se pueden encontrar en muy variado número según la especie, desde 2 a incluso 50 o 100 por célula.

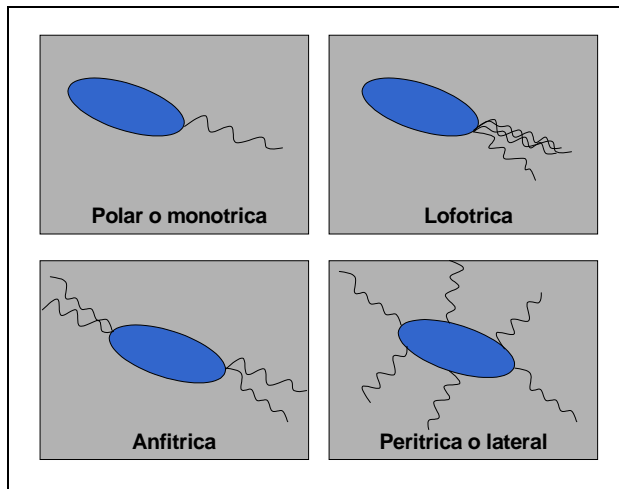


Figura 1.2 Diferentes disposiciones flagelares.

La rotación que origina la propulsión por flagelación puede tomar diferentes direcciones, que determinarán el tipo de desplazamiento. Así, las bacterias monotricas avanzan si su flagelo gira en sentido contrario a las agujas del reloj (desde fuera de la célula) y se produce un giro de la célula si la rotación es en sentido contrario, dando lugar a una voltereta. En el caso de las bacterias peritricas el resultado es el mismo, aunque teniendo en cuenta que para avanzar, todos sus flagelos se agrupan formando un haz que será el que impulse a la célula hacia delante (Prescott y col., 1999).

“Swarming”

Se trata de un desplazamiento colonial originado sobre superficies con el fin de colonizarlas, ya que facilita la difusión de la colonia y acelera la producción de biomasa. Las células se mueven en grupo de forma paralela a su eje longitudinal y manteniendo un estrecho contacto unas con otras, por lo que la respuesta al “swarming”, la cual altera ciertos parámetros de expresión génica, responde tanto a señales extracelulares como al contacto intercelular.

Los géneros que utilizan este tipo de movilidad son típicamente *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus* y *Clostridium*, aunque también está descrito en *Salmonella*, *Escherichia*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Aeromonas* y *Yersinia*. Y aunque la respuesta al “swarming” varía entre especies, en general todas comparten la diferenciación de células vegetativas a “swarmer cells”, con una extensa flagelación y filamentación, aunque ésta última no es un prerequisite. Algunas especies además secretan polisacáridos extracelulares que ayudarán al movimiento desempeñando diferentes papeles: ayudando en la adhesión y la colonización, protegiendo de la desecación y/o reteniendo nutrientes, así como otras utilizan biosurfactantes. Dado de que se trata de una respuesta reversible, en la periferia

se encuentran las células más activas de la colonia (más largas y flageladas) mientras que en el interior se han desdiferenciado recuperando su forma vegetativa original. Esta desdiferenciación también ocurre transfiriendo las células diferenciadas a un cultivo líquido (Harshey, 1994).

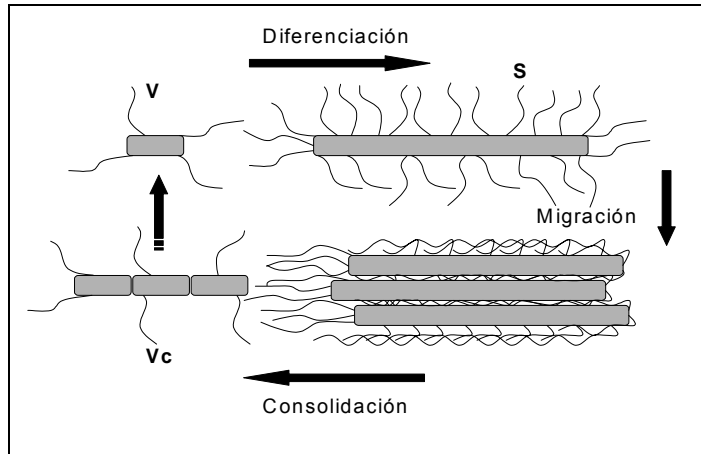


Figura 1.3 Los diferentes estados en la diferenciación en *Proteus mirabilis*. Las células vegetativas (V), se diferencian en células para el “swarming” (S), hiperflageladas y elongadas. Estas se agregan en cuerpos multicelulares para la migración, que cuando cesa (consolidación) provoca una reversión a células vegetativas (Vc).

Así como la mayoría de especies utilizan la misma maquinaria para la natación que para el “swarming”, flagelación peritrica simple, en el caso de las especies *Vibrio parahaemolyticus*, *Rhodospirillum centenum*, *Azospirillum sp.* y *Aeromonas sp.* existe flagelación mixta, con flagelos polares y peritricos (o laterales) respectivamente (McCarter, 2001).

El estímulo para la diferenciación se compone de: señales químicas extracelulares, como la densidad celular en *Proteus mirabilis* y *Salmonella enteritidis*, o el “quorum sensing” en *Serratia liquefaciens*; parámetros intracelulares como el estado fisiológico celular y/o la concentración de nutrientes y la concentración catiónica intracelular; contacto con la superficie: el incremento de viscosidad y el uso de anticuerpos contra el flagelo polar de *V. parahaemolyticus* provocan la diferenciación (Fraser y Hughes, 1999).

1.3.2 Características del flagelo

Gran parte de los conocimientos en la materia los debemos a los estudios realizados en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Macnab, 1996), así como la nomenclatura de la mayoría de proteínas y genes implicados en el sistema.

El flagelo bacteriano es un apéndice largo (puede llegar a medir hasta 15-20 μm de longitud) y delgado (aproximadamente 20 nm de diámetro), por lo cual la microscopía óptica es incapaz de detectarlo si no es con tinciones especiales que incrementan su grosor. No obstante, con microscopía electrónica sí somos capaces de observarlo.

Se ancla a la célula por un extremo y queda libre en el otro, extendiéndose hacia fuera de la membrana plasmática y de la pared celular. Su disposición en la célula varía según la especie, tal y como hemos descrito previamente, al igual que el número por célula, típicamente de 5 a 20.

Cada flagelo es una estructura helicoidal y semirrígida que se mueve por rotación conducida por potenciales iónicos, tales como protones de modo más frecuente o iones sodio en algunas especies. Esta rotación, que proporciona la fuerza de propulsión a la célula, no se da a velocidad constante sino que depende de la intensidad de la fuerza motriz, llegando incluso a propulsar a la célula en medio líquido a velocidades de 20-30 $\mu\text{m}/\text{seg}$, esto es a una media de aproximadamente 30 longitudes celulares por segundo, tratándose pues de una gran velocidad.

El movimiento flagelar originado no siempre es igual sino que depende del número y disposición del flagelo así como de la especie bacteriana, aunque a modo general podemos decir que los microorganismos con flagelación peritrica se mueven en línea recta de manera lenta, mientras que los que poseen flagelación polar lo hacen dando giros periódicos de modo rápido e impetuoso.

| | Procariotas | Eucariotas |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Diámetro | 20nm | 200nm |
| Longitud | 15-20 μm | 60 μm |
| Fuente de energía | H ⁺ ó Na ⁺ | ATP |
| Función | Rotación pasiva conducida por un motor de rotación en la membrana citoplasmática. | Rotación activa. |
| Estructura | El filamento es una estructura simple en cuanto a número de proteínas | Compleja arquitectura |

Tabla 1.1 Diferencias generales entre el flagelo procariota y el eucariota

1.3.2.1 Estructura flagelar

La estructura flagelar elemental consta de tres partes básicas y difiere mínimamente entre procariotas.

- Partes externas:

El **filamento**, la parte más larga y ciertamente propulsora para la célula, se extiende desde la base de la superficie celular hasta el extremo distal, donde se encuentra una proteína que actúa de “capuchón”, FliD. Se trata de un cilindro rígido y hueco constituido por la polimerización de la proteína denominada flagelina, que da lugar a una ultraestructura geoméricamente conservada.

Algunas bacterias tienen el filamento rodeado por una vaina de diferente estructura química, según el grupo al que pertenezcan. Es el caso de algunos *Vibrio* sp. o *Helicobacter* sp., cuya vaina membranosa es contigua a la membrana externa y similar en composición. Se desconoce cómo el flagelo rota en relación a esta estructura, así como su función, aunque generalmente incrementa la firmeza estructural y probablemente permite interacciones específicas adicionales entre bacteria y superficie.

Flagelina

En *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, cuyos filamentos están formados por 11 protofilamentos, constituidos cada uno de ellos por la polimerización de una proteína simple, la flagelina FliC, ésta se cuenta en aproximadamente 20.000 subunidades. Y aunque esto significa que todas las moléculas de flagelina en un filamento dado son idénticas, *Salmonella* expresa, aunque no al mismo tiempo, 2 flagelinas homólogas, por lo que no todos sus filamentos son iguales entre sí.

El superenrollamiento de las proteínas para generar el filamento da lugar a la forma helicoidal, que además exhibe polimorfismo, pudiendo cada protofilamento tener 2 conformaciones diferentes, afectando para ello la distancia entre repeticiones y la interacción lateral, y provocando en conjunto la existencia de 12 formas posibles de cada filamento, dos de ellas necesarias para el desarrollo de una movilidad normal: la forma helicoidal zurda y la diestra. Esto se puede traducir para el movimiento de las bacterias peritricas en la carrera, cuando el flagelo zurdo rota en sentido contrario a las agujas del reloj, o en la voltereta, donde el motor gira en el sentido de las agujas del reloj produciendo una fuerza de torcedura que transforma la forma helicoidal zurda en diestra (Samatey y col., 2001).

Aunque existen otras muchas bacterias cuyo filamento está formado por una sola flagelina, también hay especies con múltiples genes para la expresión de diferentes flagelinas, que en algunos casos, aunque no en todos, aparecen coexpresados dando lugar a los flagelos compuestos. Se trata de proteínas homólogas entre sí pero no idénticas, como es el caso del flagelo polar de *Vibrio parahaemolyticus* que cuenta con 6 flagelinas distintas, o *Caulobacter* sp. con 3. Además, se pueden dar modificaciones postraduccionales en las flagelinas tales como glicosilación, p. ej., algunas espiroquetas o especies de *Campylobacter*, o fosforilación de tirosinas, p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, que probablemente protegen a la población generando variabilidad. Con el mismo fin se pueden dar eventos genéticos tales como recombinación y transferencia génica horizontal.

Con todo lo mencionado, las flagelinas de bacterias patógenas son altamente inmunogénicas y variables en secuencia, aunque debemos destacar que muestran una clara distribución en dominios: regiones altamente conservadas entre especies, amino terminal y carboxi terminal, que permanecen en la cara interna de la proteína plegada, siendo de este modo las responsables de definir la estructura y una región central variable en aminoácidos expuesta en la superficie, siendo por lo tanto la responsable de la variabilidad antigénica.

Aunque las flagelinas completas tiene entre 300 y 600 aminoácidos (alrededor de 500 generalmente), las regiones amino terminal y carboxi terminal son suficientes para la formación del filamento. Con todo esto, las flagelinas nos proporcionan una importante herramienta como marcadores para la detección, estudios genéticos poblacionales y análisis epidemiológicos (Winstanley y Morgan, 1997).

El **gancho**, está formado por múltiples copias de una única proteína, FlgE, que polimeriza de forma helicoidal dando lugar a una estructura corta, hueca y curvada, con el único fin de poner en contacto al filamento con la tercera parte flagelar, el cuerpo basal. Es además altamente flexible. Dos proteínas denominadas: proteínas asociadas al gancho (HAPs), FlgK y FlgL, ayudan a la unión de los dos segmentos externos (gancho y filamento) adaptándolos, dado que poseen propiedades mecánicas diferentes.

Las secuencias amino terminal y carboxi terminal de la proteína que constituye el gancho poseen, al igual que las flagelinas, una alta similaridad entre especies.

•Parte interna:

El **cuerpo basal** es el segmento flagelar más complejo, ya que posee el motor que moviliza el filamento. Está embebido en la célula y constituido por un cilindro axial (formado a su vez por 4 proteínas: FlgB, FlgC, FlgF y FlgG) y 4 anillos (en bacterias Gram negativas). Los dos anillos externos, L y P, reciben su nombre por la asociación al lipopolisacárido y al peptidoglicano respectivamente y a cada uno de ellos lo forma una proteína, FlgH y FlgI, mientras que el anillo interno, MS, está en contacto con la membrana plasmática. Se trata de dos anillos juntos y formados por la misma proteína, FliF.

Las bacterias Gram positivas únicamente tienen dos anillos, uno interno y otro externo, careciendo concretamente de los anillos L y P. Aunque no sólo se observan diferencias en los cuerpos basales de estos dos grandes grupos sino que incluso se encuentran en la estructura del cuerpo basal de un flagelo polar y uno peritrico (McCarter, 2001).

Alrededor del anillo interno y ancladas en la membrana citoplasmática se encuentran las proteínas que constituyen el motor en sí, MotA y MotB, en motores que funcionan con protones, o bien proteínas similares en sistemas que funcionan con iones sodio. Otras proteínas acompañantes del complejo del motor son FliG, FliM y FliN, que constituyen el anillo C y actúan como un conmutador invirtiendo la rotación del flagelo en respuesta a las señales intracelulares (Macnab, 1996).

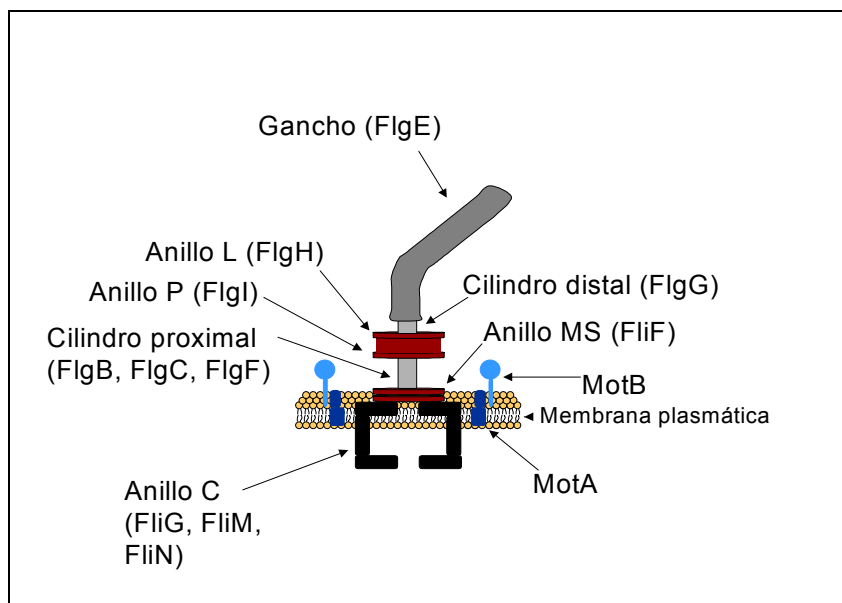


Figura 1.4 El cuerpo basal flagelar.

1.3.2.1.1 Función del motor flagelar

Como cualquier otro motor, el motor flagelar consta de dos unidades básicas, el rotor, que engloba toda la parte que rota, y el “stator”, componente fijo sobre el cual rota el rotor.

El primero está formado por la mayor parte del cuerpo basal: El cilindro axial, que actúa como eje conductor del impulso rotativo transmitiéndolo desde los anillos MS y C al filamento a través del gancho; los anillos L y P, que funcionan de manguito protector de dicho cilindro durante la rotación; el anillo MS, que actúa de plataforma para el complejo conmutador o anillo C al cual se conecta a través de la proteína FliG; y el propio anillo C, que controla la dirección de rotación flagelar.

El segundo, es decir, el “stator”, lo forman las proteínas MotA y MotB (u homólogas) que rodean el anillo MS. MotB se encuentra anclada por su gran dominio extracitoplasmático carboxi terminal al peptidoglicano de la pared celular y por un pequeño dominio amino terminal a la proteína MotA, la cual posee cuatro dominios citoplasmáticos. Ambas forman el conducto para el flujo de iones al interior celular, que provocará la generación del impulso rotativo mediante la interacción entre el “stator” y algún componente de los anillos MS-C. Se cree que este componente es la proteína FliG aunque no se conoce exactamente cómo este flujo de iones se traduce en el impulso rotativo, proponiéndose diferentes modelos para ello.

El potencial electroquímico protónico conduce un influjo de aproximadamente 1000 protones a través del canal, lo que se traduce en alrededor de 270 revoluciones por segundo. En el caso de los motores conducidos por iones sodio, la velocidad es más alta, aproximadamente 600 revoluciones por segundo.

1.3.2.2 Ensamblaje del flagelo y su control

La síntesis del flagelo bacteriano se lleva a cabo mediante un mecanismo de autoensamblaje, esto es, de forma independiente de enzimas específicas u otros factores, siendo la propia estructura de las subunidades proteicas la que lleva la información necesaria para el correcto montaje de la estructura completa. Las subunidades proteicas sintetizadas en el interior celular salen a la superficie a través del interior de la estructura naciente (tanto el cuerpo basal como el gancho y el filamento son estructuras huecas) agregándose espontáneamente en el extremo distal, de manera que el filamento crece por su extremo en lugar de por su base. Los flagelos poseen además, la capacidad de regenerarse si sufren alguna rotura mediante el mismo mecanismo.

Con la única excepción de las proteínas que dan lugar a los anillos P y L, el resto de las proteínas estructurales que han de atravesar la membrana plasmática para llegar a su destino, lo hacen a través de un sistema de exportación específico de flagelo, el aparato de exportación flagelar.

Así pues, la primera estructura que se forma es el anillo MS, seguida del anillo C, ambas ubicadas en la membrana citoplasmática. Con esta estructura como base, se puede generar el aparato de exportación por el que llegarán al exterior las proteínas formadoras del cilindro axial del cuerpo basal. Las proteínas FlgI y FlgH, que como hemos mencionado anteriormente no utilizan el aparato de exportación flagelar para dar lugar a los anillos P y L respectivamente, se secretan presuntamente por el sistema Sec dependiente. FlgI lo hace además presumiblemente de forma dependiente de la chaperona FlgA.

Una vez formado el cuerpo basal, comienza la exportación de la proteína FlgE, que dará lugar al gancho, aunque para que se de su correcto ensamblaje se requiere la proteína FlgD que formará un capuchón en el extremo distal. Seguidamente se exportan y colocan las proteínas asociadas al gancho, HAP 1 y HAP 3, que desplazarán a FlgD. Por último se exporta el capuchón del filamento formado por la proteína FliD, que quedará en el extremo más alejado de la célula, lugar donde se van ensamblando las subunidades de flagelina. También en las últimas etapas de la formación se añaden a la estructura flagelar los componentes del motor, MotA y MotB, además de secretarse el factor antisigma FlgM que uniéndose a la proteína FliA (factor sigma) controlará la longitud del filamento mediante la paralización de la expresión génica (Macnab, 1996).

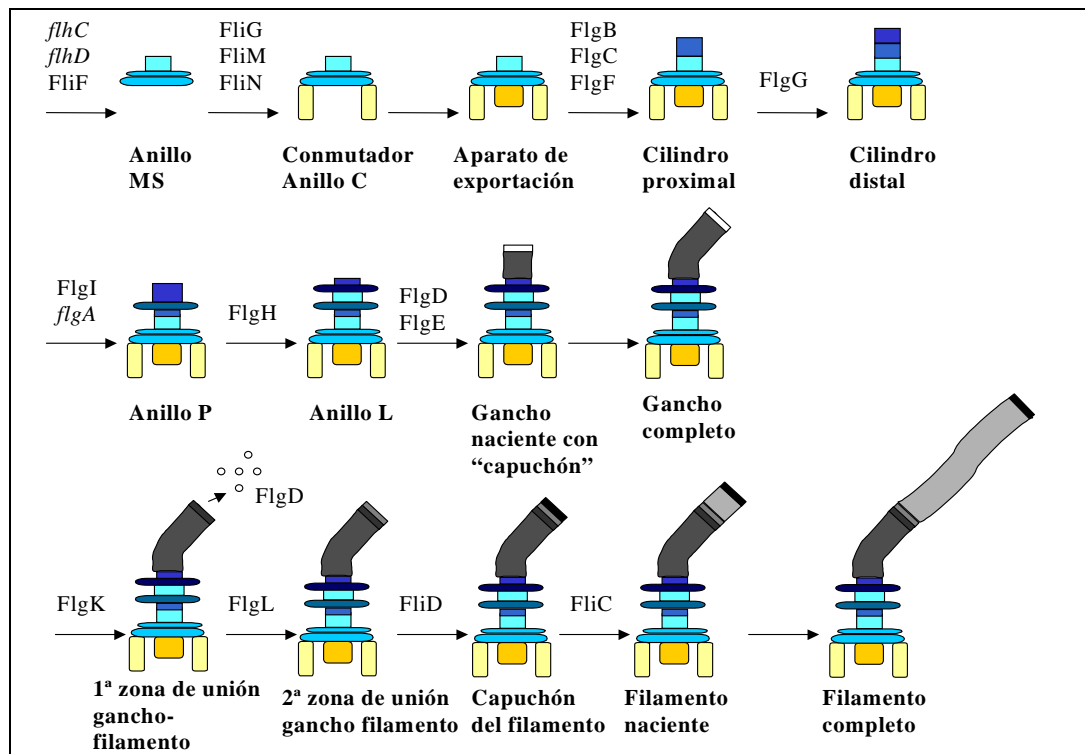


Figura 1.5 Etapas del ensamblaje del flagelo. Principales genes y/o proteínas implicadas.

1.3.2.2.1 Aparato de exportación flagelar

Las proteínas flagelares que emplean este sistema de secreción dan lugar a la familia axial de proteínas, tratándose de los componentes del cuerpo basal, gancho y filamento, exceptuando los discos P y L.

Existe una gran homología entre algunas proteínas flagelares y los componentes del aparato de secreción de tipo III, responsable de la exportación de muchas proteínas efectoras de virulencia en gran variedad de patógenos. Incluso la estructura básica de cada uno de estos sistemas es similar, consistiendo en un gran número de componentes proteicos situados entre las membranas interna y externa, que forman un estrecho canal, 25-30 angströms, cuyo núcleo es el anillo C de la estructura flagelar. Se sugiere por lo tanto una evolución en paralelo de ambos sistemas.

Los sustratos del sistema no poseen la secuencia señal Sec dependiente, aunque usan otros tipos de señalización.

La translocación proteica es un proceso activo, con lo que FliI, ATPasa específica del flagelo, sería otro componente, no estructural, del sistema, así como las diferentes chaperonas requeridas, específicas para uno o como mucho dos sustratos. Estas chaperonas interactúan con los aminoácidos carboxi terminales de los sustratos flagelares para escoltarlos hacia la secreción de los mismos, previniendo la degradación

para algunos y evitando el autoensamblaje en el interior celular, ya que las proteínas deben translocarse en un estado de desdoblamiento. Algunas de estas chaperonas son FlgN y FliT para las HAPs o FliS para FliC. (Bennett y Hughes, 2000; Aizawa, 2001).

1.3.2.3 Genética flagelar y su control

El sistema de regulación flagelar, que comprende tanto la síntesis como la función, abarca más de 50 genes estructurados en el llamado regulón flagelar, el cual se organiza en diversos operones, 15 en *Escherichia coli* y 17 en *Salmonella typhimurium*, especies en las que se apoyan los estudios más exhaustivos y las cuales dan nombre a la mayoría de genes, que en otras especies se llamarán como sus homólogos. También existen precedentes cuyos genes se distribuyen en grandes operones de movilidad, como *Borrelia burgdorferi* y *Vibrio parahaemolyticus*. Esta última posee además un segundo sistema de flagelación, Laf (McCarter, 2001) que únicamente se expresa bajo ciertas condiciones.

Todos los genes que comprenden el regulón flagelar se clasifican en al menos 3 grupos, según una transcripción jerárquica, en la cual los genes de expresión tardía requieren de los inmediatamente anteriores en la escala jerárquica, medios y tempranos respectivamente. La clasificación también se puede hacer respecto a los promotores de estos tres tipos de genes, con lo que serán promotores de clase 1, clase 2 y clase 3.

A la cabeza de esta cadena se encuentra el máster operón *flhDC*, el único cuyo promotor es de clase 1 y que codifica activadores transcripcionales. Su propia transcripción responde a múltiples factores medioambientales y al estado celular, de modo que la flagelación y el ciclo celular son interdependientes. El promotor de clase 1 también requiere otros genes fuera del regulón flagelar para su expresión.

Las proteínas FlhD y FlhC activan a los promotores de clase 2, σ^{70} dependientes, situados en la secuencia anterior de los genes medios. Estos operones codifican los genes necesarios para la morfogénesis del gancho y el cuerpo basal, además del gen *fliA*, que codifica para la subunidad de la ARN polimerasa σ^{28} y otro regulador transcripcional, FlgM, factor anti σ^{28} .

FlhDC es además un represor autógeno de la expresión de *flhDC*, pero en presencia de una incrementada actividad σ^{28} es un activador autógeno de la expresión de *flhDC*.

El factor σ^{28} confiere especificidad a los promotores de clase 3, responsables de la transcripción de los genes tardíos, entre los que se encuentran *motA* y *motB*, además de las HAPs y flagelinas.

La proteína FlgM, mencionada anteriormente, sensa el estado de desarrollo del flagelo, siendo uno de los sustratos para la secreción a través del aparato de secreción flagelar. Cuando se completa la estructura gancho-cuerpo basal, ésta ya es competente para la secreción de las HAPs y la flagelina, así como para FlgM, que al disminuir su concentración celular, desrepreiona al factor σ^{28} que permanece en el interior celular, permitiendo la transcripción de los genes tardíos.

Cabe añadir que el sistema de regulación genética flagelar es aun más complejo, ya que algunos de los genes se expresan por más de una clase de promotor (Chilcott y Hughes, 2000).

1.3.3 Patogenicidad del flagelo

La movilidad proporciona a las bacterias múltiples beneficios frente a su huésped, como lo son un incremento en la obtención de nutrientes o la capacidad de escapar de sustancias tóxicas, así como la habilidad de acceder a los lugares óptimos para la colonización y su dispersión durante el curso de transmisión. De hecho, a este nivel es la capacidad de quimiotaxis lo que se considera un factor de virulencia en infecciones naturales, ya que permite el acceso al organismo huésped (Ottermann y Miller, 1997).

El flagelo, además, también participa de forma importante en la adhesión, mediando a menudo el contacto de la célula a la superficie. Además, como orgánulo de propulsión, el flagelo podría ayudar a vencer las interacciones electroestáticas negativas, jugando de este modo un importante papel en las etapas iniciales de la adsorción a superficies, formación de biofilm e invasión de huéspedes. En flagelos envainados, el lipopolisacárido, proteínas u otros componentes de la vaina podrían permitir interacciones específicas adicionales entre bacteria y superficie.

Cabe añadir que aquellos patógenos que migran adicionalmente mediante “swarming” tienen una mayor facilidad para la colonización y formación de biofilms, tal como ocurre en *Proteus mirabilis*, aun existiendo una potencial desventaja de las células hiperflageladas frente al sistema inmunitario por ser el flagelo una putativa diana para la respuesta a anticuerpos. No obstante, esta desventaja puede ser vencida por la variación antigénica de la flagelina que pueden desarrollar algunas bacterias (Fraser y Hughes, 1999), o bien por las modificaciones postraduccionales a que puede ser sometida.

Es también importante destacar que en muchos casos existe una expresión corregulada entre los genes flagelares y factores de virulencia, p.ej., *Proteus mirabilis* y *Serratia liquefaciens*.

2.1 Cepas bacterianas

| Cepa | Genotipo y/o fenotipo | Procedencia |
|---------|--|----------------------|
| AH-3 | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:34 | Merino y col., 1990 |
| AH-1726 | Mutante derivado de AH-3 por recombinación en un punto de pSF- <i>flmB</i> Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| O:3 | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:3 | Aguilar y col., 1997 |
| AH-1881 | Mutante derivado de O:3 por recombinación en un punto de pSF- <i>flmB</i> Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| O:3B | Mutante derivado de O:3 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafB</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| O:3T | Mutante derivado de O:3 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafT</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| O:25 | <i>Aeromonas hydrophila</i> O:25 | Aguilar y col., 1997 |
| AH-1882 | Mutante derivado de O:25 por recombinación en un punto de pSF- <i>flmB</i> Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| AH-1 | <i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>sobria</i> O:11 | Aguilar y col., 1997 |
| AH-1883 | Mutante derivado de AH-1 por recombinación en un punto de pSF- <i>flmB</i> Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| AH-1B | Mutante derivado de AH-1 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafB</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| AH-1T | Mutante derivado de AH-1 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafT</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| AS-28 | <i>Aeromonas veronii</i> bv. <i>veronii</i> O:11 | Aguilar y col., 1997 |
| AH-1884 | Mutante derivado de AS-28 por recombinación en un punto de pSF- <i>flmB</i> Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| AS-28B | Mutante derivado de AS-28 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafB</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| AS-28-T | Mutante derivado de AS-28 por recombinación en un punto de pSF- <i>lafT</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |
| AH-3R | Mutante espontaneo de AH-3 Rif ^r | Gavín y col., 2002 |
| AH-1982 | Mutante de AH-3R con inserción del miniTn5 Km en el gen <i>lafB</i> | Gavín y col., 2002 |
| AH-1983 | Mutante de AH-3R con inserción del miniTn5 Km en el gen <i>lafS</i> | Gavín y col., 2002 |
| AH-1984 | Mutante de AH-3R con inserción del miniTn5 Km en el gen <i>lafT</i> | Gavín y col., 2002 |
| Sch3 | <i>Aeromonas caviae</i> , aislado clínico | Wilcox y col., 1992 |
| Sch3N | Mutante espontaneo de Sch3N NaI ^r | Gryllos y col., 2001 |
| AAR58 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>lafA1</i> | Gavín y col., 2002 |
| AAR39 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Cm en <i>lafA1</i> | Gavín y col., 2002 |
| AAR5 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>lafA2</i> | Gavín y col., 2002 |
| AAR6 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Cm en <i>lafA1</i> y Km en <i>lafA2</i> | Gavín y col., 2002 |
| AAR9 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>lafB</i> | Gavín y col., 2002 |
| AAR20 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>fliU</i> | Gavín y col., 2002 |
| Sch3NT | Mutante derivado de Sch3N por recombinación en un punto de pSF- <i>lafT</i> Km ^r | Gavín y col., 2002 |

| | | |
|---------------|--|--------------------------------|
| AAR269 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>flaA</i> | Rabaan y col., 2001 |
| AAR27 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>flaB</i> | Rabaan y col., 2001 |
| AAR31 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Cm en <i>flaA</i> y Km en <i>flaB</i> | Rabaan y col., 2001 |
| AAR150 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>flaG</i> | Rabaan y col., 2001 |
| AAR59 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>flaH</i> | Rabaan y col., 2001 |
| AAR8 | Mutante derivado de Sch3N por inserción de determinante de resistencia a Km en <i>flaJ</i> | Rabaan y col., 2001 |
| IAG75 | Mutante de Sch3N con inserción del miniTn5 Cm en el gen <i>flmD</i> | Gryllos y col., 2001 |
| IAG570 | Mutante de Sch3N con inserción del miniTn5 Cm en el gen <i>flmB</i> | Gryllos y col., 2001 |
| IAG1419 | Mutante de Sch3N con inserción del miniTn5 Cm en el gen <i>neuA</i> | Gryllos y col., 2001 |
| IAG1639 | Mutante de Sch3N con inserción del miniTn5 Cm en el gen <i>flmB</i> | Gryllos y col., 2001 |
| O:1,....,O:44 | Diferentes serotipos de <i>Aeromonas</i> spp. mesófilas | Sakazaki y Shimada 1984 |
| 1,....100* | Diferentes cepas de <i>Aeromonas</i> mesófilas de procedencia clínica (50), alimentaria (40) y de peces moribundos (10) | España, UK, USA |
| HGs | Diferentes cepas de referencia de <i>Aeromonas</i> según grupo de hibridación | Janda, 1991 |
| A450 | <i>A. salmonicida</i> | Munn y col., 1982 |
| 1,...49* | Diferentes cepas de <i>A. salmonicida</i> aisladas de peces moribundos | Canadá, España, Japón, UK, USA |
| CC118λpir | <i>E. coli</i> Δ(ara, leu) ₇₆₉₇ araD ₁₃₉ ΔlazX74 glaE glaK pho A20 thi-1 rspE | Herrero y col., 1990 |
| BW19851 | <i>E. coli</i> RP4-2tet::Mu-1Km::Tn7 integrant/ΔuidA::pir ⁺ recA1 hsdR17 creB510 endA1 zbf-5 thi | Metcalf y col., 1994 |
| DH5α | <i>E. coli</i> F ⁻ en dA hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyr-A96 80lacZ | Hanahan, 1983 |
| MC1061λpir | <i>E. coli</i> thi thr1 leu6 proA2 his4 argE2 lacY1 galk2 ara14 xyl5 supE44 λpir | Rubires y col., 1997 |
| SM10λpir | <i>E. coli</i> thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km ^r pir | Rubires y col., 1997 |
| S17-1 | <i>E. coli</i> hsdR pro recA RP4-2 en cromosoma Km::Tn7 (Tc::Mu) Tp ^r Sm ^r | Simon y col., 1983 |
| S17-1λpir | <i>E. coli</i> hsdR pro recA RP4-2 en cromosoma Km::Tn7 (Tc::Mu) λpir Tp ^r Sm ^r | Miller y Mekalanos, 1988 |

| | | |
|----------------------|--|-------------------------|
| S17-1 miniTn5 Km-1 | <i>E. coli</i> (thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km ^r λpir) que contiene el plásmido pUTminiTn5 Km-1 | De Lorenzo y col., 1990 |
| BW19851 mini-Tn5::Cm | <i>E. coli</i> (RP4-2tet::Mu-1Km::Tn7 integrant/ΔuidA::pir ⁺ recA1 hsdR17 creB510 endA1 zbf-5 thi) que contiene el plásmido pUTminiTn5Cm | De Lorenzo y col., 1990 |
| XL1-Blue | <i>E. coli</i> recA1 lacI ^q ZΔM15 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 Tn10 (tet ^r) | Stratagene |
| HB101 | <i>E. coli</i> Pro, leu, thi, lacY, str ^r , endoI ⁻ , recA ⁻ | Ditta y col., 1985 |

*Estas cepas fueron clasificadas como *Aeromonas* según el sistema AerokeyII (Carnahan y col., 1991), y se diferenciaron en especies según los tests bioquímicos apropiados (Janda y col., 1995).

2.2 Vectores utilizados

| Vector | Características principales | Procedencia |
|-------------|---|----------------------|
| pLA2917 | Cósmido con resistencia a kanamicina y tetraciclina | Allen y Hanson, 1985 |
| pLA-Flm | pLA2917 con el gen <i>flmB</i> de la cepa AH-3 completo | Gryllos y col., 2001 |
| pCOS-LAF | pLA2917 con el locus <i>laf</i> de AH-3 completo procedente de una genoteca | Gavín y col., 2002 |
| pGEM-T easy | Vector para clonaje de fragmentos obtenidos por PCR. Contiene el gen lacZ y resistencia a ampicilina | Promega |
| pBCSK(+/-) | Vector de 3,4 kb derivado de pUC19. Contiene el gen lacZ y resistencia a cloranfenicol. | Stratagene |
| pRK2073 | Plásmido derivado de pRK2013 facilitador de la conjugación. Presenta resistencia a espectinomomicina | Ditta y col., 1985 |
| pFS100 | Plásmido suicida derivado de pGP704, λpir con resistencia a kanamicina | Rubires y col., 1997 |
| pSF-Flm | pFS100 con un fragmento interno (672 pb) del gen <i>flmB</i> | Gryllos y col., 2001 |
| pSF-LafB | pFS100 con un fragmento interno (619 pb) del gen <i>lafB</i> de AH-3 | Gavín y col., 2002 |
| pSF-LafT | pFS100 con un fragmento interno (671 pb) del gen <i>lafT</i> de AH-3 | Gavín y col., 2002 |
| pACYC184 | Plásmido derivado de p15A1 con resistencia a cloranfenicol y tetraciclina | Chang y col., 1978 |
| pACYC-MOT | pACYC184 con los genes <i>lafT</i> y <i>lafU</i> completos de AH-3 | Gavín y Cohen, 2002 |
| pUC18 | Vector de clonaje de alto número de copias, MCS, Amp ^r | Gibco BRL |
| pUI2224 | pUC18 con un fragmento de 2'2 kb del ADN de Sch3N en la diana <i>HindIII</i> , 4'9 kb, Amp ^r | Gryllos y col., 2001 |
| pUI2814 | pUC18 con un fragmento de 2'8 kb del ADN de Sch3N en la diana <i>HindIII</i> , 5'5 kb, Amp ^r | Gryllos y col., 2001 |

| | | |
|-----------|---|----------------------|
| pUC19 | Vector de clonaje de alto número de copias, MCS, Amp ^r | Gibco BRL |
| pARL1 | pUC19 con un fragmento de 6 kb <i>Bam</i> HI del ADN de Sch3N en la diana <i>Bam</i> HI | Gavín y col., 2002 |
| pARL23 | pUC19 con un fragmento de 1'6 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de pARL1 en las dianas <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III | Gavín y col., 2002 |
| pARL12 | pUC19 con un fragmento de 4'4 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de pARL1 en las dianas <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III | Gavín y col., 2002 |
| pARLA20 | pUC19 con un fragmento de 1 kb <i>Pst</i> I del ADN de Sch3N en la diana <i>Pst</i> I | Gavín y col., 2002 |
| pUC4-KIXX | Derivado del Tn5 (<i>nptII</i>), Km ^r | Pharmacia |
| pKNG101 | oriR6K, mobRK2, strAB, sacBR, 6'8 kb, Sm ^r | Kaniga y col., 1991 |
| pARLA70 | pKNG101 con un fragmento <i>Pst</i> I de 1 kb de <i>A. caviae</i> el cual contiene el cassette de kanamicina de 1'4 kb procedente de pUC4KIXX en la diana <i>Hinc</i> II del gen <i>lafA1</i> | Gavín y col., 2002 |
| pARL124 | pKNG101 con el gen <i>lafA2</i> de <i>A. caviae</i> el cual contiene el cassette de kanamicina de 1'4 kb procedente de pUC4KIXX en la diana <i>Hinc</i> II de dicho gen | Gavín y col., 2002 |
| pARLA43 | pKNG101 con un fragmento <i>Pst</i> I de 1 kb de <i>A. caviae</i> el cual contiene el cassette de Cm de 3'7 kb procedente de pUTminiTn5Cm en la diana <i>Hinc</i> II del gen <i>lafA1</i> | Gavín y col., 2002 |
| pARLB110 | pKNG101 con el gen <i>lafB</i> de <i>A. caviae</i> el cual contiene el cassette de kanamicina de 1'4 kb procedente de pUC4KIXX en la diana <i>Pvu</i> II de dicho gen | Gavín y col., 2002 |
| pARF510 | pKNG101 con el gen <i>fliU</i> de <i>A. caviae</i> el cual contiene el cassette de kanamicina de 1'4 kb procedente de pUC4KIXX en la diana <i>Pvu</i> II de dicho gen | Gavín y col., 2002 |
| pDSK519 | Vector de clonaje de alto número de copias y amplio rango de huéspedes, 8'1 kb, Km ^r | Keen y col., 1988 |
| pDI2211 | pDSK519 con un fragmento de 2'2 kb del ADN de Sch3N en la diana <i>Hind</i> III, 10'3 kb Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| pDI284 | pDSK519 con un fragmento de 2'8 kb del ADN de Sch3N en la diana <i>Hind</i> III, 10'9 kb Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| pDI54 | pDI2211 con el fragmento de 2'8 kb del ADN de Sch3N en la diana <i>Hind</i> III tras el fragmento de 2'2 kb, 13'1 kb Km ^r | Gryllos y col., 2001 |
| pINA1 | pACYC184 con un fragmento de 2,4 kb que contiene el gen <i>lafA</i> de A450 y la transposasa, Tc ^r | Este trabajo |
| pINA2 | pACYC184 con un fragmento de 1,5 kb que contiene el gen <i>lafB</i> de A450, Tc ^r | Este trabajo |
| pINA3 | pACYC184 con un fragmento de 0,9 kb que contiene el gen <i>lafS</i> de A450, Tc ^r | Este trabajo |
| pINA4 | pACYC184 con un fragmento de 1,3 kb que contiene el gen <i>lafT</i> de A450, Tc ^r | Este trabajo |

2.3 Cebadores utilizados

Los cebadores utilizados en este trabajo, tanto para la realización de las PCRs como para la obtención de secuencias, han sido diseñados mediante el programa informático *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison Wisconsin)* y sintetizados por Amersham Pharmacia Biotech y Genotek.

2.3.1 Cebadores de vectores

2.3.1.1 Cebadores del vector pLA2917

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Diana de restricción |
|--------|---------------------|-----------|-----------------------------------|----------------------|
| CSpLA | gactgggcgggtttatgg | 18 | 56 | <i>Bgl</i> II |
| RpLA | ccatctgttcaatcatgca | 20 | 58 | <i>Bgl</i> II |

2.3.1.2 Cebadores del vector pBCSK

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) |
|---------|----------------------|-----------|-----------------------------------|
| T3 | aattaaccctcactaaaggg | 20 | 56 |
| M13 for | tgtaaacgacggccagt | 18 | 54 |

2.3.1.3 Cebadores de los vectores pUC18 y pUC19

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) |
|---------|------------------------|-----------|-----------------------------------|
| M13 for | tgtaaacgacggccagt | 18 | 54 |
| M13 rev | tcacacaggaaacagctatgac | 22 | 60 |

2.3.1.4 Cebadores del vector pGEMTeasy

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) |
|---------|--------------------|-----------|-----------------------------------|
| Sp6 | tatttagtgacactatag | 19 | 50 |
| M13 for | tgtaaacgacggccagt | 18 | 54 |

2.3.2 Cebadores en el transposón miniTn5Km1/ miniTn5Cm

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) |
|--------|---------------------|-----------|-----------------------------------|
| ISI | agatctgatcaagagacag | 19 | 50 |
| ISO | acttggtataagagtcag | 19 | 50 |

2.3.3 Locus *flm*

2.3.3.1 *Aeromonas hydrophila*

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Localización |
|--------|-----------------------|-----------|-----------------------------------|--------------|
| FLMA3 | aggcgggatccgtacc | 18 | 58 | <i>flmA</i> |
| FLMA5 | gttggtctgatgcactc | 18 | 54 | <i>flmA</i> |
| FLMA6 | ccagcattttatgcaaagag | 20 | 58 | <i>flmA</i> |
| FLMC | gagaagttgcatgaagtgatg | 21 | 60 | <i>flmA</i> |
| FLMB3 | tccgattttctgactcaggg | 20 | 60 | <i>flmB</i> |
| FLMB5 | gtcatgcggtagttgaaacc | 20 | 60 | <i>flmB</i> |
| FLMB6 | cgactctcagcttgccac | 18 | 58 | <i>flmB</i> |
| FLMB7 | gggggaaattgattcaccag | 20 | 60 | <i>Snt</i> |
| FLMB8 | acaccaagagccagacaag | 19 | 58 | <i>flmB</i> |
| FLMB9 | cgaagacttcatcaacg | 18 | 52 | <i>flmB</i> |

2.3.3.2 *Aeromonas caviae*

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Localización |
|--------|----------------------|-----------|-----------------------------------|--------------|
| FLMA1 | atggagcgacaagctgac | 19 | 58 | <i>flmA</i> |
| FLMA2 | cgtaatagcgcccaaadc | 19 | 58 | <i>flmA</i> |
| FLMB1 | acaagagatcaccagcaag | 20 | 60 | <i>flmB</i> |
| FLMB2 | tctgattttctaactcaggg | 20 | 56 | <i>flmB</i> |
| FLMB3C | tcattaacgcaccgagagg | 19 | 58 | <i>flmB</i> |
| FLMB4 | gtcattcggtagttaaagcc | 20 | 60 | <i>flmB</i> |

| | | | | |
|--------|-----------------------|----|----|-------------|
| FLMB5C | tgaacattcaccgccgatacc | 20 | 54 | <i>flmB</i> |
| NEUA | tgaatattgccatcatccc | 19 | 54 | <i>neuA</i> |
| NEUA2 | ttgccgtgcatacacag | 18 | 54 | <i>neuA</i> |
| NEUA3 | aatagcttctcagcacgcg | 19 | 58 | <i>neuA</i> |
| FLMD1 | tcagagatggcaaggcaag | 19 | 58 | <i>flmD</i> |
| FLMD2 | ttctgggtgcaagtgcc | 18 | 54 | <i>flmD</i> |
| FLMD3 | agcagtgaaaacgtggtg | 18 | 54 | <i>flmD</i> |
| FLMD4 | gaaagtagcgaaccctgtg | 19 | 58 | <i>flmD</i> |
| FLMD5 | aaaaaaggcgctgcgatg | 18 | 54 | <i>flmD</i> |
| NEUB1 | ctctccgctaaccacaatg | 19 | 58 | <i>neuB</i> |
| NEUB2 | ttaccatcccatagcccac | 19 | 58 | <i>neuB</i> |
| NEUB3 | tacgctgcctaagtctgac | 19 | 58 | <i>neuB</i> |
| SAS | ctttacataacgcagcaa | 19 | 52 | <i>neuB</i> |

2.3.4 Flagelo lateral

2.3.4.1 *Aeromonas hydrophila*

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Localización |
|--------|---------------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|
| GM132 | catccaccaaagtaaccag | 19 | 56 | <i>lafA</i> |
| LAFA2 | ttcatgctggtgatg | 18 | 56 | <i>lafA</i> |
| LAFA3 | tctgctgaaaaccggtgg | 18 | 56 | <i>lafA</i> |
| GLAFA | gatgccatctctatgatcc | 19 | 56 | <i>lafA</i> |
| LAFAC | attcccgcttttgagcc | 19 | 58 | <i>lafA^a</i> |
| LAFAD | tctgctgaccttgatgcc | 19 | 58 | <i>lafA</i> |
| LAFAF | ggagaaaattgagccggag | 19 | 58 | <i>lafA</i> |
| LAFAE | tcaccagttcaaaacggg | 19 | 56 | <i>lafA^a</i> |
| LAF1 | ggtctgcatcaactc | 17 | 54 | <i>lafA</i> |
| LAF2 | gctccagacggtgatg | 17 | 54 | <i>lafA</i> |
| GISI2 | ttctgctgctgtaaattg | 18 | 52 | <i>labB</i> |
| LAFBF | caaggatagtggttgag | 19 | 58 | <i>labB</i> |
| LAFGC | ctcgctcaagaagttgtc | 19 | 56 | <i>lafB</i> |
| LAFGD | aaacgcgatggtgcttg | 18 | 55 | <i>lafB</i> |
| LAFGI | caaagcaccatcgcggtt | 18 | 56 | <i>LafB</i> |

| | | | | |
|-------|----------------------|----|----|-------------------------|
| LAFB2 | atcgaacgcaagaacatgg | 19 | 56 | <i>lafB</i> |
| LAFB3 | atggtcaacggattgtccc | 19 | 58 | <i>lafB</i> |
| GLAFB | atttccaacccactatcc | 19 | 56 | <i>lafB</i> |
| LAF5 | atcgctggaggtcatcttg | 19 | 58 | <i>lafB</i> |
| LAFC | gcaatttgagcgtaaagggc | 20 | 60 | <i>lafC</i> |
| LAFCB | gccctttacgctcaaattgc | 20 | 60 | <i>lafC</i> |
| LAFC2 | tagaattcgagactcgcc | 18 | 54 | <i>lafX</i> |
| LAFE | cagtcgctccattgactg | 18 | 56 | <i>lafE</i> |
| LAFE2 | ttgctgcgcaatggcaag | 18 | 56 | <i>lafE</i> |
| LAFF1 | ccttggtgatcaacacttc | 19 | 56 | <i>lafF</i> |
| LAFF2 | agtcgcactcaactctgg | 18 | 56 | <i>lafF</i> |
| KISI2 | tcatcaagcatggcaccac | 19 | 58 | <i>lafS</i> |
| LAFS2 | cacagccagttcctgctc | 18 | 58 | <i>lafS</i> |
| LAFSR | tgagttgacacatcacc | 19 | 56 | <i>lafS</i> |
| LAFS7 | ttgcacaaacagtgcgtc | 18 | 56 | <i>lafS</i> |
| LAFS3 | aggctccttgaattctg | 19 | 58 | <i>lafT</i> |
| LAFSF | gaaaatgacgccaagacc | 18 | 54 | <i>lafT</i> |
| LAFS4 | caagaggacatgctcaa | 19 | 56 | <i>lafT</i> |
| LAFS5 | aaatctattctgatcgcc | 19 | 56 | <i>lafT</i> |
| LAFT1 | tggtgttcatgatggcgg | 19 | 58 | <i>lafT</i> |
| LAFT2 | tagtcgtcgggataagctg | 19 | 58 | <i>lafT</i> |
| LAF9 | ccagattctttccgctg | 19 | 58 | <i>lafU</i> |
| LAFU | tgccgatgatggcattttc | 20 | 58 | <i>lafU</i> |
| LAFU2 | tgatgatgagcgcgagatg | 19 | 58 | <i>lafU</i> |
| LAFU3 | tcgccgtattgaactgctg | 19 | 58 | <i>lafU</i> |
| LAFU4 | attgccaatcacccatcg | 19 | 56 | <i>lafU^b</i> |
| LAFT3 | cgagttgctgaccttgatg | 19 | 58 | <i>LafU</i> |
| LAFU5 | caggagccagaaaaccaac | 19 | 58 | <i>lafU^b</i> |
| LAFU6 | accacagctttgtgactcc | 19 | 58 | <i>lafU^b</i> |

a: Secuencia intergénica anterior al gen señalado

b: Secuencia intergénica posterior al gen señalado.

2.3.4.2 *Aeromonas caviae*

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Localización |
|--------|---------------------|-----------|-----------------------------------|--------------|
| FLIU1 | aaggctctgctgtcgatgc | 19 | 58 | <i>fliU</i> |
| LAF2-1 | aacaagatgttgggcaccg | 19 | 58 | <i>lafA1</i> |
| LAFBC1 | tatcccctattcggtggc | 19 | 58 | <i>lafB</i> |
| LAFBC2 | agtaccatgctgaccttgc | 19 | 58 | <i>lafB</i> |

2.3.4.3 *Aeromonas salmonicida*

| Nombre | 5' composición 3' | Long (pb) | T ^a "hibridación" (°C) | Localización |
|--------|-----------------------|-----------|-----------------------------------|-------------------------|
| SLAF1 | gctcaatttttccatgcc | 20 | 60 | <i>lafA^a</i> |
| LAF3 | gaacaccgatatggcgaatg | 20 | 60 | <i>lafA</i> |
| SLAF3 | gttctgtccaactccaacc | 19 | 58 | <i>lafA</i> |
| LAF6 | atccgaatgcaccagtacc | 19 | 58 | <i>IS</i> |
| LAF8 | taacgatgcgggctgttc | 19 | 58 | <i>IS</i> |
| LAF7 | atgaccgtcagcgttatc | 19 | 58 | <i>IS</i> |
| SLAF4 | gttcaaacatgtacaactcgc | 21 | 60 | <i>lafB^b</i> |
| SLAF9 | acagaactagagactcgcc | 19 | 58 | <i>lafX</i> |
| LAF10 | ccatagaccgacaacgaac | 19 | 58 | <i>lafE</i> |
| SLAF5 | attccaaagctctctgctc | 19 | 56 | <i>lafF</i> |
| SLAF6 | tgaaaatgacgccaagacc | 19 | 56 | <i>lafT</i> |
| SLAF7 | tgctctcactctattaccagc | 21 | 62 | <i>lafS</i> |
| SLAF8 | gcttcactgtccatgatgc | 19 | 58 | <i>lafU</i> |
| LAF4 | gcatcatggagactgaagc | 19 | 58 | <i>lafU</i> |

a: Secuencia intergénica anterior al gen señalado

b: Secuencia intergénica posterior al gen señalado.

2.4 Medios de cultivo

2.4.1 Caldo:

Luria-Bertani Miller (LB): peptona tríptica de caseína (10g/l)

extracto de levadura (5g/l)

cloruro sódico (10g/l).

Caldo de triptona y soja (TSB): peptona de caseína (10g/l)
peptona de soja (3g/l)
cloruro sódico (5g/l)
fosfato monopotásico (2,5g/l)
dextrosa (2,5g/l).

Infusión de cerebro y corazón (BHIB): extracto de cerebro (7,8g/l)
extracto de corazón (9,7g/l)
proteasa peptona (10g/l)
dextrosa (2g/l)
cloruro sódico (5g/l)
fosfato disódico (2,5g/l)

2.4.2 Agar:

LB agar: LB +1,5% agar
TSA: TSB + 1,5% agar
Agar de movilidad: 1% triptona, 0,5% NaCl, 0,25% agar
Agar para “swarming”: medio de base + 0,6% agar

2.4.3 Antibióticos:

Ácido nalidíxico (Nal): 20 µg/ml
Ampicilina (Amp): 50 µg/ml
Cloranfenicol (Cm): 25 µg/ml
Estreptomicina (Sm): 50 µg/ml
Kanamicina (Km): 50 µg/ml
Rifampicina (Rif): 50 µg/ml
Tetraciclina (Tc): 20 µg/ml

2.4.4 Otros suplementos:

Isopropil-B-D-tiogalactopiranosidasa (IPTG): 0,5 mM
5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosidasa (X-Gal): 80 :g/ml

2.5 Obtención del lipopolisacárido

La obtención del lipopolisacárido se llevó a cabo mediante el método descrito por Darveau y Hancock en 1983. A partir de crecimientos en fase estacionaria, se resuspendió el sedimento celular correspondiente a 200µl de crecimiento en 25-50µl de tampón de muestras de proteínas. (Si se obtenían las fracciones de bajo peso molecular se resuspendía en tampón de núcleo: Tris-HCl 0,06M pH 8, EDTA 1mM, SDS 2%, azul de Bromofenol 4%, 2-mercaptoetanol 8%). Seguidamente, se incubó a 100°C durante 10 minutos. Una vez frío, se incubó a 58°C durante 2 horas en el mismo volumen de proteinasa K (1mg/ml). De este modo, se conseguía la degradación de las proteínas. Para visualizar la extracción en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, se utilizaron 10-15µl. Para observar las extracciones de las fracciones de bajo peso molecular se realizó electroforesis en geles de Tris-Tricina utilizando 2-4µl de muestra.

2.6 Obtención de proteínas celulares totales

Las proteínas celulares totales se obtuvieron a partir de las cepas de *Aeromonas* tras un crecimiento estático durante toda la noche en BHIB o TSA a 37, 30 o 20°C según la cepa. Se centrifugaron fracciones equivalentes de células y el pellet se resuspendió en 50 a 200 µl de tampón de carga para SDS-PAGE (Sambrook y col., 1989) para hervir posteriormente las muestras durante 5 minutos antes de añadir el mismo volumen de agua destilada y volver a hervir durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5'000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se recuperaron los sobrenadantes.

2.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El estudio del perfil electroforético de las proteínas y del LPS, se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) según el método de Laemmli, (1970), modificado por Ames y col., (1974). En la parte superior (gel de compactación) se utilizó un porcentaje de acrilamida del 5%, y en la parte inferior (gel de resolución) un porcentaje del 12 %. La electroforesis se realizó a 10mA (60V) en el gel de compactación y 20mA (150V) en el gel de resolución.

En el análisis de proteínas, se realizó tinción con azul de Coomassie utilizando las condiciones descritas por Fairbanks y col., (1971).

En el estudio del lipopolisacárido, los geles se tiñeron con nitrato de plata según el método de Tsai y Frasch (Tsai y Frasch, 1982).

El estudio del perfil electroforético de las fracciones de bajo peso molecular del LPS se realizó mediante geles de Tris-Tricina según el método de Pradel y Schnaitman

(Pradel y Schnaitman, 1991). El gel de compactación contenía un 4,5% de acrilamida y el gel de resolución un 15%. La electroforesis se llevó a cabo a 10mV tanto en el gel de compactación como en el gel de resolución.

2.8 Purificación de flagelina y análisis de la secuencia N-terminal

Se recogió el crecimiento bacteriano de 30 placas de TSA tras incubarlas a 37°C durante 16 horas y se resuspendió en 50 ml de tampón Tris-Cl (20mM, pH 8,0). Los flagelos se separaron de la suspensión bacteriana por homogenización en hielo con un minipimer durante 5 minutos. Se centrifugó (10'000 x g, 4°C, 30 minutos) y se filtró el sobrenadante a través de membranas de 0,2 µm. La flagelina parcialmente purificada se recuperó por adición de sulfato de amonio sólido a una concentración del 20%. La solución se mantuvo en agitación durante toda la noche a 4°C y el precipitado se recuperó mediante centrifugación (20'000 x g, 4°C, 30 minutos). El pellet se resuspendió en 1 ml de tampón Tris-Cl (20mM, pH 8,0) y se dializó contra el mismo tampón. Las muestras de la proteína se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham). La flagelina fue visualizada en la membrana por tinción "amido black" al 0,2% en ácido acético al 7% y la banda correspondiente a la proteína se recortó. Se añadió acetona fría para disolver la nitrocelulosa y precipitar la proteína. Para recuperarla se centrifugó (13'000 x g, 4°C, 10 minutos) y se lavó tres veces con acetona fría. La acetona residual se eliminó en el speed vac y la proteína purificada se resuspendió en 500 µl de tampón Tris-Cl (20mM, pH 8,0).

Tras la electroforesis SDS-PAGE la banda de flagelina purificada se transfirió a una membrana nitrocelulosa Hybond-C (Amersham) y se secuenció utilizando el procedimiento de degradación automática Edman en un secuenciador de fase gaseosa Applied Biosystems 470A con un analizador on-line 120A phenylthiohydantion.

2.9 Obtención de anticuerpos

Para la obtención de anticuerpos específicos se inmunizaron conejos Dwaf Lop-eared con el antígeno específico, emulsión de aproximadamente 200 µg de flagelina purificada con 1 ml de adyuvante Freund. Se inocularon subcutáneamente en una primera dosis así como en dos repetidas ocasiones a las 4 y 6 semanas respectivamente de la primera inyección. Diez días después de la última inmunización se extrajeron 20 ml de sangre de la vena marginal de la oreja del animal.

La sangre obtenida se incubó durante 1 hora a 37°C, se mantuvo 16 horas a 4°C y se centrifugó a 4'000 r.p.m durante 20 minutos para eliminar la fracción celular. De esta manera dispusimos de suero anti-flagelina lateral de *A. caciae* Sch3N.

2.10 Western blot de proteínas totales

Tras separar las proteínas en geles de electroforesis (SDS-PAGE), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro mediante el sistema Semi-Dry Blot, en presencia de tampón de transferencia (25mM Tris, 190mM glicina, 20% metanol) durante 30 minutos a 30V en frío (4°C) y éstas se bloquearon con un 5% de leche desnatada. Posteriormente se chequearon con una mezcla de anticuerpos de conejo policlonales anti-flagelina polar y lateral respectivamente (1:1000), o bien únicamente con cada uno de los anticuerpos por separado según el experimento. El anticuerpo sobrante se eliminó con cinco lavados en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 (8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,15g/l Na₂HPO₄, 0,2g/l KH₂PO₄) de 5 minutos cada uno y se añadió un anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa (1:1000). Se procedió de nuevo a la eliminación de anticuerpo sobrante mediante cinco lavados con PBS. El anticuerpo unido se detectó tras añadir 2 ml de 4-cloro-1-naftol al 0,5% (Sigma) preparado en metanol y diluido en 8 ml de PBS que contenían 50 µl de H₂O₂ al 30%.

2.11 Detección de grupo glicosil

Este procedimiento se llevó a cabo tal y como describen Doig y col., (1996). Tras la electroforesis de las proteínas (SDS-PAGE) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y los grupos glicosil fueron oxidados durante 30 minutos con periodato de sodio 10mM en tampón acetato de sodio (50mM, pH 5,5). Tras la oxidación se añadió biotina-hidracida 5 mM en el mismo tampón durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces en TBS pH 7,5 (10mM Tris-Cl, 0,85%NaCl) y se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% en TBS durante una hora en agitación. La membrana se lavó de nuevo tres veces en TBS para añadirle avidin-D peroxidasa (Vector Labs) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con TBS tres veces se reveló mediante adición de 2 ml de 4-cloro-1-naftol al 0,5% preparado en metanol y diluido en 8 ml de tampón fosfato salino (PBS) que contenía un 0,15% de H₂O₂.

De manera alternativa se empleó el método de Gerard que utiliza el reactivo Schiff para teñir directamente el gel y detectar los grupos glicosil. (Gerard, 1990).

2.12 Cultivo de células HEP-2

El cultivo celular fue mantenido tal como describe el método (Thornley y col., 1996), para realizar ensayos tanto de adhesión como de invasión sobre células HEP-2.

2.12.1 Ensayo de adhesión

El ensayo de adhesión se llevó a cabo con una ligera modificación a partir del descrito en (Carrello y col., 1988). Las bacterias se hicieron crecer en BHIB estáticamente a 37°C, después se centrifugaron a 1'600 X g durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,2 a 10^6 - 10^7 UFC/ml ($A_{600} \sim 0,07$). La monocapa se infectó con 1 ml de la resuspensión bacteriana durante 90 minutos a 37°C y 5% CO₂. Tras la infección, las bacterias no adheridas se eliminaron de la monocapa mediante tres lavados con PBS. Las bacterias adheridas y la monocapa se fijaron con metanol 100% durante 5 minutos. El metanol se eliminó lavando con PBS y las muestras se tiñeron con tinción Giemsa 10% (vol/vol) en tampón Giemsa, durante 45 minutos. La muestra se dejó secar al aire, se montó y se observó en el microscopio óptico a X1'000 aumentos con aceite de inmersión. Se visualizaron 20 células HEP-2 de cada cubreobjetos y se contaron las bacterias adheridas. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado o triplicado.

Las diferencias entre la adhesión de las cepas salvajes frente a los mutantes y/o transconjugantes se analizaron estadísticamente mediante el test de la *t* con el software Microsoft Excel.

2.12.2 Ensayo de invasión

Los ensayos de invasión se realizaron tal y como describe Merino y col., (1997c). Tras los lavados de la monocapa, ésta se equilibró respecto a la temperatura añadiendo medio, el cual además contenía gentamicina (100µg/ml) para eliminar las bacterias extracelulares. Tras 90 minutos de incubación, la monocapa se lavó dos veces y se lisó con Triton X-100 0,01% durante 30 minutos. Posteriormente se contaron las bacterias intracelulares encontradas. La habilidad de invasión se expresó como el porcentaje de inóculo superviviente al tratamiento con gentamicina.

Las diferencias entre la habilidad de invasión de las cepas salvajes frente a los mutantes y/o transconjugantes se analizaron estadísticamente mediante el test de la *t* con el software Microsoft Excel.

2.13 Ensayo de movilidad

2.13.1 “Swimming”

2.13.1.1 Agar de movilidad

Colonias procedentes de un cultivo fresco bacteriano se transfirieron con un palillo estéril al centro de una placa de agar de movilidad (1% triptona, 0,5% NaCl, 0,25% agar). Las placas se incubaron cara arriba a 20, 30 o 37°C según la cepa y de 16 a 24 horas, y la movilidad se valoró examinando la migración de la bacteria a través del agar desde el centro a la periferia de la placa.

2.13.1.2 Test de la gota pendiente

Colocábamos una gota de un cultivo bacteriano fresco y líquido sobre un cubreobjetos en el que previamente se había puesto una pequeña cantidad de silicona en cada esquina. Cubríamos entonces con un portaobjetos excavado haciendo coincidir la gota con la excavación. Girábamos lentamente de manera que la gota nos quedase colgante. Tras poner aceite de inmersión a la muestra ésta se observaba en un microscopio óptico a X1'000 aumentos.

2.13.2 “Swarming”

Colonias procedentes de un cultivo fresco bacteriano se transfirieron con un palillo estéril al centro de una placa de agar para swarming (medio de base, 0,6% agar). Las placas se incubaron cara arriba a 20, 30 o 37°C según la cepa, de 16 a 24 horas, y la movilidad se valoró examinando la migración de la bacteria a través del agar desde el centro a la periferia de la placa.

2.14 Microscopía electrónica

Las suspensiones bacterianas a observar se depositaron en rejillas de cobre cubiertas por Formvar y se tiñeron negativamente con una solución al 2% de potasio fosfotúngstico, o bien con solución de acetato de uranilo también al 2%. Las bacterias se visualizaron en un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 600.

2.15 Formación de biofilm *in vitro*

Se llevó a cabo un ensayo cualitativo descrito previamente, (Pratt y Kolter, 1998) con ligeras modificaciones. Del crecimiento bacteriano crecido en TSA se resuspendieron algunas colonias en medio líquido (TSB junto con el antibiótico adecuado si se requería). Se hicieron alícuotas de 100 µl en placas de microtitulación de poliestireno y éstas se

incubaron durante 48 horas a 30°C de forma estática. Las placas se lavaron entonces con abundante agua y se fijaron con gluteraldehído al 2,5%; se lavó de nuevo con agua y finalmente se hizo la tinción con cristal violeta al 0,4%. Tras solubilizar el cristal violeta con una solución de etanol/acetona (80/20), se determinó la absorbancia a 570nm.

2.16 Técnicas de genética molecular

2.16.1 Aislamiento y purificación de ADN

2.16.1.1 Aislamiento de ADN genómico

Se utilizaron dos métodos de aislamiento de ADN en función de la cantidad y la pureza requeridas. La obtención de gran cantidad de ADN genómico se llevó a cabo según el método descrito por Marmur (Marmur, 1961) que se basa en una lisis celular con SDS y una posterior precipitación con perclorato sódico 5M. Si se requería un material de elevada pureza, se utilizó el kit de Invitrogen para aislamiento de ADN total (*Easy chromosomal DNA extraction kit*).

2.16.1.2 Aislamiento de ADN plasmídico

En este caso también se utilizaron diferentes métodos de extracción según el número de copias del plásmido, la cepa portadora de dicho plásmido y la pureza requerida para los procedimientos posteriores.

De este modo, la obtención de plásmidos de bajo número de copias o la obtención de cualquier plásmido a partir de *Aeromonas* spp. se llevó a cabo según el método basado en la lisis alcalina de Birboim (Birboim, 1979) descrito por Maniatis (Maniatis y col., 1982) con las modificaciones aplicadas por Martínez y de la Cruz., (1988). Para realizar extracciones de mayor pureza, siempre que se realizaran a partir de *Escherichia coli* se utilizaron columnas de purificación de ADN plasmídico (*Qiagen plasmid midi-prep preparations*) en plásmidos de un número de copias medio o alto y (*Qiagen plasmid purification-handbook*) en el caso de plásmidos de bajo número de copias. En ambos casos siguiendo las recomendaciones de la propia casa comercial.

2.16.2 Fenolización del ADN

La fenolización del ADN permite extraer las proteínas que contaminan las preparaciones de ADN. Para ello, se resuspendió el ADN en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA) y se añadió igual volumen de fenol equilibrado. Después de agitar suavemente para obtener un emulsionado, se centrifugó brevemente para separar las dos fases. Se recuperó la fase superior (acuosa) y se le adicionó igual volumen de fenol:cloroformo (cloroformo: isoamilalcohol 1:24), se agitó y centrifugó igual que en el

paso anterior. Con la fase acuosa obtenida se repitió el mismo proceso con cloroformo. Una vez recuperada la última fase acuosa se precipitó el ADN.

2.16.3 Precipitación del ADN

La precipitación de ADN se llevó a cabo mediante el método descrito por Maniatis y col., (1982). Este método consiste en añadir acetato sódico en una proporción 1:10 respecto al volumen total de ADN. Seguidamente se adiciona etanol 98% frío 2:1 respecto al volumen final obtenido en el paso anterior. Esta mezcla se mantiene a -20°C 2 horas y se centrifuga a $10'000\times g$ durante 15 minutos. Se realizan dos lavados secuenciales con etanol 70% frío y se seca la muestra en el speed vac.

2.16.4 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Se utilizaron concentraciones de agarosa entre 0,5% a 2%, según el tamaño de los fragmentos a separar (Maniatis y col., 1982). La agarosa se gelificó en tampón TAE1X (Tris 242g/l, EDTA 0,05M pH 8, ácido acético glacial 57,1 ml/l). Para visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio (agente intercalante) al gel, a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de ADN se mezclaron, en una proporción 1/5 del volumen total, con tampón de muestras X6 (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25%). La electroforesis se realizó en cubetas horizontales Mini de Ecogen aplicando un voltage de 5-10V/cm (Lewis, 1986). Los geles se observaron y/o fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta (302nm) (Image Master VDS de Pharmacia Biotech).

2.16.5 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó gracias a la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio al intercalarse entre las bases de la doble hélice de ADN. En un mismo gel de agarosa (0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio) se cargaron distintas cantidades del ADN a cuantificar y 1 μg de ADN del fago λ digerido con la endonucleasa *HindIII*. Se cuantificó la concentración de ADN por comparación entre la intensidad de las bandas de las muestras respecto a las del patrón.

2.16.6 Purificación de fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante el sistema QIAEX según el protocolo indicado en el kit.

En algunas ocasiones (obtención de fragmentos de cromosómico para construcción de genoteca), los fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve, FMC Bio Products). Las bandas de interés debían contener un mínimo de 0,2 μg de ADN (Zupacnic y col., 1988). El punto de fusión de la

agarosa utilizada está comprendido entre 65°C-70°C, y se mantiene líquida a temperaturas superiores a 30°C. Por este motivo, el montaje y la electroforesis se realizó en una cámara fría. Una vez realizada la electroforesis, se recortaron las bandas de interés y se fundieron a 65°C. Posteriormente se fenolizó y se precipitó el ADN.

2.16.7 Construcción de una librería genómica

Para realizar la digestión del ADN cromosómico de la cepa de la cual se quería obtener la genoteca, *A. hydrophila* AH-3 en este caso, se utilizó la enzima de restricción *Sau3A*. Esta endonucleasa presenta una diana de restricción de cuatro pares de bases, de manera que la frecuencia de restricción es elevada. Los extremos cohesivos que genera son compatibles con *Bam*HI, *Bgl*II, *Mbo*I y *Xho*I. Se digirió parcialmente el ADN cromosómico con esta enzima, utilizando la misma cantidad de ADN y diluyendo la unidad de enzima a la mitad de manera seriada. Tras una electroforesis en geles de agarosa, se escogieron aquellos fragmentos cuyo tamaño estaba comprendido entre 15-20kb y se ligaron al cósmido pLA2917 digerido con *Bgl*II. El empaquetamiento *in vitro* en el fago λ y la posterior infección de la cepa *E. coli* DH5 α se llevó a cabo según el protocolo descrito por la casa suministradora del kit de empaquetamiento (*Gigapack III Gold Packaging Extract* de Stratagene).

En el caso de la cepa *A. caviae* Sch3N se trabajó con minilibrerías de ADN cromosómico. Por un lado se empleó la enzima de restricción *Hind*III para clonar los fragmentos resultantes de la digestión en el plásmido pUC18, manteniendo los clones en la cepa de *E. coli* XL1blue. También se construyó una minilibrería clonando los fragmentos obtenidos en la digestión del ADN cromosómico de *A. caviae* Sch3N con *Pst*I y comprendidos entre 0,8 y 1,2 kb aproximadamente. El conjunto de bandas recortadas se clonó en la diana *Pst*I del vector pUC19. Los clones se mantuvieron en la cepa *E. coli* XL1blue. Del mismo modo se obtuvo una tercera minilibrería clonando en este caso los fragmentos de alrededor de 6kb obtenidos de la restricción del ADN cromosómico del mutante AAR58 de *A. caviae* Sch3N con *Bam*HI. Estos se clonaron en la misma diana del vector pUC19 y se mantuvieron de nuevo en *E. coli* XL1blue. En los tres casos, la selección de los clones se realizó mediante el sistema blanco/azul, suplementando las placas de LB agar con ampicilina, X-Gal, IPTG.

2.16.8 Reacciones enzimáticas con el ADN

2.16.8.1 Restricciones

Las enzimas de restricción utilizadas habitualmente fueron suministradas por Amersham Pharmacia Biotech. El ADN se diluyó en agua desionizada. Se mezcló la

cantidad a digerir de dicho ADN con la endonucleasa y el tampón (según las condiciones indicadas por la casa comercial) y se incubó 2 horas a 37°C.

2.16.8.2 Defosforilación

La desfosforilación se realizó según las condiciones descritas por Sambrook y col., (1989), modificando la extensión del tratamiento a 1,5 horas con la adición de enzima cada 30 minutos. La enzima y el tampón utilizados fueron suministrados por Amersham Pharmacia Biotech.

2.16.8.3 Ligación

Las reacciones de ligación se realizaron en una relación molar 3:1 (inserto: vector). En las ligaciones entre moléculas con extremos cohesivos, se mezclaron 0,01-0,1 µg de ADN total (inserto y vector) diluidos en agua con una unidad de enzima, tampón y agua hasta un volumen final de 20 µg. Si las ligaciones se daban entre moléculas de extremos no protuberantes, o si el vector utilizado era el cósmido pLA2917, se aumentó la cantidad de ADN y de enzima. Las incubaciones se realizaron a 15°C durante toda la noche.

La enzima utilizada, T4 ADN-ligasa fue suministrado junto con el tampón de ligación, por Gibco-BRL.

2.16.8.4 Obtención de extremos romos

Para obtener extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes se utilizó la enzima *Klenow* polimerasa suministrada por Boehringer Mannheim, según las recomendaciones hechas por la casa comercial.

2.16.9 Transferencia de ADN

2.16.9.1 Electroporación

La obtención de cepas bacterianas preparadas para la electrotransformación se realizó según el método descrito por Dower y col., (1988). A estas cepas se electroporó 0,3-0,4 µg de ADN. Las condiciones de electroporación fueron la aplicación de un voltaje de 2kV, con una resistencia de 129 Ω durante 5 milisegundos. El aparato utilizado fue un *BTX Electro Cell Manipulator 600* con cubetas *BTX* de 2mm. Seguidamente, por adición de 1 ml de medio LB, se recuperaron las células de la cubeta y se incubaron 1 hora a la temperatura requerida por la cepa receptora para facilitar la expresión fenotípica. Transcurrido este tiempo, se sembraron en placas preparadas para la selección de los transformantes.

2.16.9.2 Conjugación

Se mezclaron en filtros de nitrocelulosa (0,45 μm de poro) depositados en placas de LB, crecimientos en fase estacionaria de la cepa donadora, facilitadora y de la receptora en una proporción 1:1:5. La cepa facilitadora de la conjugación fue en todas las conjugaciones triparentales llevadas a cabo, HB101 + pK2073. La placa se incubó a 30°C durante 6-8 horas, o toda la noche si se requería aumentar la eficiencia de la conjugación. Posteriormente, se recogió el filtro resuspendiéndolo en LB y se sembraron diluciones seriadas en placas preparadas para la selección de los transformantes.

2.16.10 Detección de fragmentos de ADN

2.16.10.1 Preparación de sondas

A partir de fragmentos de ADN purificados de geles de agarosa, se marcaron con digoxigenina mediante la incorporación al azar de dUTP-digoxigenina según la técnica de *random primer*. Para ello, se utilizaron las condiciones descritas en el kit de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Amersham Pharmacia Biotech. Otras de las sondas empleadas en este trabajo se obtuvieron haciendo uso de dNTP marcados con digoxigenina (Roche) directamente en la reacción de PCR.

2.16.10.2 Colony blot

Se sembraron las colonias procedentes de una genoteca, de manera ordenada, en placas de LB. Éstas se incubaron a 37°C durante un mínimo de 5 horas. Después de mantener las placas 30 minutos a 4°C, para facilitar la posterior transferencia, se transfirieron, por simple contacto (1 minuto) a membranas de nylon de 82 mm de diámetro y 1,2 μm de poro, suministradas por Boehringer Mannheim. Después de secar las membranas a temperatura ambiente durante 15 minutos, se realizaron, de forma secuencial, incubaciones de 3 minutos en SDS 10%, 15 minutos en solución desnaturizante (NaOH 0,5M, NaCl 1,5M), 15 minutos en solución neutralizante (NaCl 1,5M Tris-HCl 1M pH 7,4) y 10 minutos en SSC X 2 (NaCl 3M, Na-citrato 0,3M pH 7,0). Seguidamente se fijó el ADN por iluminación ultravioleta durante 7 minutos en un *UV crosslinker* de Hoefer.

Una vez fijado el ADN, se realizó un tratamiento con proteinasa K para eliminar los restos celulares. Se añadió sobre cada membrana una solución de 2 mg/ml de proteinasa K en SSC X 2 y se incubaron 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se colocaron las membranas entre papeles de filtro humedecidos con agua y efectuando una cierta presión los restos celulares se transfirieron al papel de filtro. Seguidamente se procedió a

la hibridación y revelado de las membranas según el método indicado en el kit de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Amersham Pharmacia Biotech.

2.16.10.3 Southern blot

Los ADNs que se pretendían hibridar con las sondas previamente preparadas se sometieron, en primer lugar, a una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% en tampón TBE X 1 (Tris 0,89M, ácido bórico 0,89M, EDTA 0,02M pH 8,3). El grosor de estos geles era menor al habitual para minimizar el tiempo de transferencia y facilitar la misma. La transferencia a membranas de nylon de 0,45 μm de poro, Hybond-N⁺ de Amersham Pharmacia Biotech, se llevó a cabo mediante el *Vacuum blotting System* de Pharmacia Biotech, según las instrucciones suministradas por los fabricantes. Para proceder a la hibridación y revelado se siguió el método descrito en el kit de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Amersham Pharmacia Biotech; las moléculas marcadas se detectan mediante inmunoensayo, utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina que da lugar a una reacción cromática por la adición de los substratos NBT y X-fosfato.

2.16.10.4 DOT blot

El ADN se desnaturalizó mediante 5 minutos a 100°C y se mantuvo en hielo otros 5 minutos antes de pipetear la muestra sobre membranas de nylon de 0,45 μm de poro, Hybond-N⁺ de Amersham Pharmacia Biotech. Las membranas se dejaron secar al aire antes de proceder a la hibridación y revelado según el método descrito en el sistema de marcaje y detección de sondas de ADN no radioactivas de Amersham Pharmacia Biotech.

2.16.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.16.11.1 Amplificación de fragmentos de ADN

Para amplificar fragmentos de ADN se utilizó generalmente la *taq DNA polymerase* suministrada por Gibco BRL, y se usó el kit acompañante así como las indicaciones del mismo (5 μl del tampón para PCR (X10), 1 μl de una mezcla de nucleótidos 10 mM, 1,5 μl de MgCl_2 50 mM, 0,5 μM de cada cebador, 2,5 U de enzima *taq polimerasa* y el ADN que queríamos amplificar disuelto en agua desionizada, hasta conseguir un volumen final de reacción de 50 μl . La concentración de MgCl_2 se ajustó en algunas ocasiones.

La PCR se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 3 minutos,

para posteriormente realizar 25-30 ciclos de: 94°C - 45 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 72°C - tiempo de elongación (1kb = 1 minuto). Finalmente se realizó un ciclo de 72°C – 10 minutos para completar la amplificación del fragmento.

En casos determinados se hizo uso de la *Pfu DNA polymerase* (Stratagene) con la actividad añadida 3'-5' exonucleasa, la cual genera extremos romo en los fragmentos amplificados. Los ciclos requeridos en el termociclador fueron los mismos que en el caso anterior.

También de manera alternativa se usó la *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen), que por indicación del fabricante necesita MgSO₄ en lugar de MgCl₂, además de funcionar según un ciclo inicial de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos y 25-30 ciclos de: 94°C - 30 segundos, temperatura de hibridación ADN/cebador - 30 segundos, 68°C - tiempo de elongación (1kb = 1 minuto).

2.16.11.2 Secuenciación de fragmentos de ADN

Para la secuenciación de fragmentos de ADN, ya fuesen vectores o bandas amplificadas mediante PCR, se utilizó el protocolo descrito en el sistema *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* de Perkin Elmer, mezclando 2 µl del kit con 0,25 µg de ADN y 3,2 pmoles del cebador en un volumen final de reacción de 10 µl. Para la secuenciación del ADN cromosómico bacteriano, también siguiendo las instrucciones de la casa comercial, se emplearon 16 µl del kit, de 2 a 3 µg de ADN y de 6 a 13 pmol del cebador, todo ello en un volumen final de 40 µl.

Se realizó la secuenciación en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de Perkin Elmer. Se llevó a cabo un ciclo inicial de 96°C durante 4 minutos, 25 ciclos de: 96°C - 30 segundos, temperatura hibridación ADN/cebador – 15 segundos y 60°C – 4 minutos. Para secuenciar ADN cromosómico el ciclo inicial fue de 95°C durante 5 minutos, seguido de un mínimo de 45 ciclos de: 95°C – 30 segundos, temperatura hibridación ADN/cebador – 20 segundos y 60°C – 4 minutos.

La temperatura de hibridación ADN/cebador se determinó generalmente según la siguiente fórmula: $[2 \times (A+T)] + [(G+C) \times 4]$

La obtención de la secuencia correspondiente fue llevada a cabo por los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona. El cromatograma nos lo proporcionó el programa Chromas (versión 1.43).

2.16.12 Mutagénesis

2.16.12.1 Por inserción de transposón

2.16.12.1.1 Mini-Tn5::Km

La mutagénesis se llevó a cabo por inserción genómica de un elemento de transposición, el mini-Tn5::Km1.

La transferencia del mini-Tn5 se realizó mediante conjugación triparental entre la cepa portadora de dicho transposón, *S₁₇₋₁λpyr* mini-Tn5::Km1 y la cepa receptora, aquella que se pretende mutagenizar. La selección de los mutantes se produjo a 30°C en placas de LB agar suplementado con antibióticos.

La posterior secuenciación a partir de cebadores diseñados en dicho transposón, permiten identificar el gen mutagenizado por este método.

2.16.12.1.2 Mini-Tn5::Cm

En este caso, el elemento de transposición es el mini-Tn5::Cm.

La transferencia del mini-Tn5 se realizó mediante conjugación entre la cepa portadora de dicho transposón, BW19851 mini-Tn5::Cm y la cepa receptora. La selección de los mutantes se produjo a 30°C en placas de LB agar suplementado con antibióticos.

La posterior secuenciación a partir de cebadores diseñados en dicho transposón, permiten identificar el gen mutagenizado por este método.

2.16.12.2 Por recombinación en un punto

La obtención de mutantes se realizó por recombinación en un punto, utilizando el vector suicida pFS100 según el protocolo descrito por Rubires y col., (1997). Este método se basa en realizar una construcción de un fragmento interno del gen a mutagenizar en pFS100. Posteriormente se transforma la construcción en la cepa de *E. coli* MC1061(λpir), la cual se utilizará para pasar el plásmido mediante conjugación a la cepa a mutar. La recombinación en un punto de dicha construcción en el cromosoma genera dos copias truncadas del gen deseado.

2.16.12.3 Mutagénesis definida

Esta mutagénesis se basa en la inserción de un determinante de resistencia a Km derivado de Tn5 y extraído del vector pUC4-KIXX en el gen a mutar. El cassette contiene un promotor que asegura la expresión de los genes situados en posición posterior al gen truncado cuando se inserta en la orientación correcta (Bott y col., 1995). Se digiere el

determinante con la enzima de restricción *Sma*I y se inserta en un fragmento de restricción interna de cada gen a mutar.

Una vez realizadas las construcciones con el gen mutado, éstas se ligan al vector suicida pKNG101, y se transfieren a la cepa salvaje mediante conjugación (Rabaan y col., 2001). Se seleccionan las colonias mediante antibióticos y se confirma por hibridación que éstas contienen el determinante de resistencia a Km pero no el vector pKNG101 para así corroborar que se ha dado una doble recombinación.

En el caso de las cepas con doble mutación, esta segunda se realizó mediante la inserción en el gen a mutar de un determinante de resistencia a Cm procedente la digestión *Hind*III del plásmido pUTminiTn5Cm. Del mismo modo que en el caso anterior, se liga la construcción al vector suicida pKNG101, y se transfiere mediante conjugación al mutante con el que se quiera formar la pareja de genes mutados.

2.16.13 Clonaje del ADN flanqueante al mini Tn5 Km/Cm

El ADN flanqueante al mini-Tn5Km1 de cada uno de los mutantes fue recuperado mediante digestiones *Eco*RI (una diana en un extremo del transposón), *Pst*I (una diana en el otro extremo del transposón) o *Eco*RV (el transposón no posee dianas). Tras la restricción el ADN fue ligado al vector pBCSK en las mismas dianas, para secuenciarlo con cebadores de cada uno de los extremos del plásmido, M13 for y T3, así como de los extremos del transposón, ISI e ISO.

Para los mutantes con mini-Tn5Cm se realizó una PCR inversa. El ADN cromosómico de cada uno de los mutantes fue digerido en la diana *Pst*I y tras precipitarlo se religó a 15°C durante toda la noche. Después se cogieron muestras de 100 a 200 ng para someterlas a PCR inversa con cebadores de los extremos del transposón, ISI e ISO. La banda amplificada se ligó al vector pUC18 en la diana *Sma*I y posteriormente se secuenció, con los cebadores M13 rev y M13 for.

2.16.14 Complementación

Tras llevar a cabo las construcciones necesarias con los genes salvajes, éstas se transfirieron mediante conjugación al mutante en cuestión, y se seleccionó con la ayuda de antibióticos. De este modo pudimos comprobar mediante pruebas fenotípicas si los transconjugantes recuperaban el fenotipo salvaje.

2.16.15 Software para el análisis de secuencias

Para el estudio y análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron diferentes programas informáticos.

Se utilizó el programa informático *GCG (Wisconsin Package Version 9.0, Genetic Computer Group, Madison Wisconsin)* para la detección de pautas abiertas de lectura, localización de dianas para enzimas de restricción, traducción de secuencias de ADN a proteína, detección de secuencias terminadoras y diseño de cebadores, o bien se empleó indistintamente el *Seqaid 3.81* (Rhoads y Roufa, Kansas University, 1991).

La búsqueda de secuencias de ADN y proteínas homólogas en GenBank, EMBL y *Protein Identification Resource* se realizó mediante el programa BLAST (Altschul y col., 1990). Las secuencias de aminoácidos también se compararon frente a bases de datos de Pirprot y Swiss-prot mediante el programa FASTA (Pearson y Lipman, 1988).

Los alineamientos entre secuencias se llevaron a cabo mediante el programa PileUp (Feng y Doolittle) y el Box Shade Server. Los perfiles de hidrofobicidad se calcularon de acuerdo al método de Kyte y Doolittle, 1982. Gracias a los programas PSORT y TMHMM de ExPASy se detectaba la localización celular de la proteína y sus posibles regiones transmembrana, respectivamente. Con los programas Prot Param y Prot Scale de ExPASy analizamos las principales características de las proteínas. La agrupación de las proteínas en familias según sus dominios conservados se llevó a cabo con el programa pFAM de Sanger Center. La búsqueda de putativos promotores se llevó a cabo principalmente con el software para la predicción de promotores de la www.fruitfly.org.

Número de acceso a la secuencia nucleotídica. Las secuencias nucleotídicas referidas en este trabajo se pueden encontrar en el GenBank bajo los números de acceso: AF126256, AF348135, AY028400 y AY129557.

3.A.1 Resultados

Basándonos en el importante papel que desarrollan tanto la movilidad bacteriana como el flagelo como factores de virulencia, debido a su implicación en el proceso de adhesión celular, se decidió profundizar en el estudio de la flagelación en *Aeromonas* spp. mesófilas mediante su caracterización genética y fenotípica.

3.A.1.1 Obtención de mutantes por inserción de un mini-Tn5 Cm no adherentes de la cepa Sch3N de *A. caviae*

Para comenzar el estudio se generaron mutantes por la inserción del elemento de transposición mini-Tn5Cm tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Los conjugantes obtenidos se hicieron crecer en LB agar suplementado con ácido nalidíxico y cloranfenicol entre 48 y 72 horas. Se subcultivaron alrededor de 2000 mutantes generados, los cuales se estudiaron de forma cualitativa por reducción en la adhesión a células HEp-2 mediante ensayos de adhesión. Se seleccionaron y aislaron 14 de los mutantes por mostrar un promedio del 15% de la adhesión de la cepa salvaje Sch3N. De todos ellos se confirmó la presencia del transposón mediante Southern blot de digestiones totales (*Pst*I) del ADN cromosómico de cada uno de los mutantes y empleando como sonda un fragmento de dicho transposón marcado con digoxigenina. Dado que el transposón no poseía dianas *Pst*I, se encontraron, tras el revelado de la hibridación, bandas simples de diferente tamaño en los distintos mutantes, indicando inserciones de un único transposón en cada genoma; estas bandas además nos permitieron hacer una estimación del tamaño del ADN de *A.caviae* que flanqueaba el mini-Tn5.

3.A.1.2 Caracterización fenotípica de los mutantes

3.A.1.2.1 Caracterización preliminar de 4 mutantes no adherentes

De los 14 mutantes seleccionamos 4 de ellos, IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 por ser los que poseían un menor porcentaje de adhesión respecto de la cepa salvaje Sch3N, concretamente un 10% según los ensayos realizados tras hacer crecer a 37°C y de forma estática en caldo BHI tanto a los mutantes como a la cepa salvaje (Tabla 3.A.1). Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado en ocasiones separadas, y se calculó para cada cepa el valor medio de bacteria adherida a células HEp-2 \pm la desviación estándar.

Todos ellos poseían además una banda de igual tamaño en el Southern blot con digestión *Pst*I, banda entre 6 y 6,5 kb, de lo que se dedujo que el transposón se

encontraría en el mismo fragmento de sus respectivos ADNs cromosómicos, estimado entre 2,5 y 3 kb. Los 4 mutantes además poseían el mismo fenotipo en los siguientes ensayos descritos.

| Cepa | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 \pm SD |
|-----------------|---|
| Sch3N (control) | 23.5 \pm 4.8 |
| IAG75 | 1.7 \pm 1.5 (7.2) |
| IAG570 | 1.25 \pm 0.9 (5.3) |
| IAG1419 | 3.5 \pm 2.7 (14.9) |
| IAG1639 | 3.2 \pm 3.15 (13.6) |

Tabla 3.A.1 Ensayos de adhesión en *A. caviae* sobre células HEp-2. Los valores entre paréntesis son porcentajes respecto al control.

3.A.1.2.2 Ensayos de movilidad

Al hacer crecer los mutantes en caldo BHI y de forma estática, estos presentaban precipitación al fondo del tubo a diferencia de *A. caviae* Sch3N, que crecía formando una suspensión turbia. Esto nos sugirió que estas cepas podrían carecer de movilidad, lo que confirmamos por la incapacidad de moverse que presentaban en placas de agar de movilidad (0,25% agar).

3.A.1.2.3 Expresión de flagelina

También a modo de confirmar la incapacidad de moverse de los mutantes, procedimos a la extracción de proteínas totales de cada uno de ellos para una posterior detección de la flagelina polar mediante inmunoblot. Las proteínas se obtuvieron tras el crecimiento de las células en caldo BHI a 37°C durante 16 horas y se procedió a la realización del inmunoblot tal y como se describe en Material y Métodos, con anticuerpo anti-flagelina polar (1:500). Ninguno de los mutantes resultó positivo en la detección de dicha flagelina, a diferencia de la cepa salvaje, lo que indicaría la ausencia de flagelación polar por la pérdida de la proteína.



Figura 3.A.1 Inmunoblot para la identificación de flagelina polar en proteínas totales de Sch3N (línea 1) y los mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 (líneas 2, 3, 4 y 5, respectivamente)

3.A.1.2.4 Efecto de la centrifugación de los mutantes sobre células HEp-2

Con el fin de determinar si la movilidad por sí misma era necesaria en el proceso de adhesión, las bacterias crecidas durante toda la noche y a 37°C en caldo BHI se centrifugaron sobre las monocapas de células HEp-2 previamente a los 90 minutos del periodo de infección. Este experimento ocasionó que se evitaran los defectos en movilidad de los mutantes y como resultado se vio incrementada la adhesión de todas las cepas analizadas (Tabla 3.A.2). Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado en ocasiones separadas, y se calculó para cada cepa el valor medio de bacteria adherida a células HEp-2 \pm la desviación estándar.

En el caso de la cepa salvaje, Sch3N el incremento fue de 23,5 a 54,5 bacteria/célula HEp-2. Para los mutantes IAG75 e IAG1419 se cuantificaron incrementos del 49,1 y 33,6% respecto a Sch3N, respectivamente, mientras que para los otros dos mutantes IAG570 e IAG1639 los incrementos fueron menores, del orden del 19,6 y 11,7% respectivamente.

| Cepas centrifugadas | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 \pm SD |
|---------------------|---|
| Sch3N (control) | 54.55 \pm 15.55 |
| IAG75 | 26.8 \pm 3.2 (49.1) |
| IAG570 | 10.7 \pm 1.9 (19.6) |
| IAG1419 | 18.35 \pm 8.35 (33.6) |
| IAG1639 | 6.4 \pm 1.25 (11.7) |

Tabla 3.A.2 Efecto de la centrifugación de *A. caviae* sobre células HEp-2 previamente a la infección. Los valores entre paréntesis son porcentajes respecto al control.

3.A.1.3 Caracterización genética de los mutantes

Llegado este punto del estudio, contábamos con 4 mutantes de *A. caviae* Sch3N por inserción en su genoma de un mini-Tn5, todos ellos con una clara disminución de la adhesión a células HEp-2 así como una carencia de la flagelación polar. Con tal de concretar el gen afectado por la mutación, procedimos al clonaje del transposón para poder secuenciar las zonas adyacentes al mismo.

3.A.1.3.1 Clonaje de la secuencia interrumpida por el mini-Tn5Cm

Para clonar el mini-Tn5 de los mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 se realizó una PCR inversa de los fragmentos de ADN cromosómico resultantes de una

digestión total con *Pst*I y posteriormente religados de cada uno de ellos, tal como se describe en Material y Métodos. Las condiciones de la PCR, realizada con la *Pfu* ADN polimerasa, fueron las siguientes: 2'5 mM de MgCl₂, 50°C para la hibridación cebador/ADN y 8 minutos de extensión.

El producto obtenido en la amplificación, consistente en los fragmentos adyacentes hasta la primera diana *Pst*I de cada mutante, se ligó en la diana *Sma*I del vector pUC18, previamente defosforilado para evitar religados y se transfirió mediante electroporación a la cepa XL1-Blue de *E. coli*. La selección de los clones se realizó suplementando las placas de LB agar con ampicilina, X-Gal e IPTG.

3.A.1.3.2 Secuenciación de las zonas adyacentes al mini-Tn5Cm

Dicho producto amplificado y posteriormente clonado, presentaba el mismo tamaño en los cuatro mutantes, 2,6 kb. Con la ayuda de cebadores específicos para los extremos del vector pUC18, M13 rev y M13 for, se secuenciaron todos los fragmentos clonados. De la secuencia nucleotídica obtenida y tras compararla en bases de datos, se dedujo que entre los cuatro mutantes había tres genes diferentes mutados en el mismo fragmento de restricción *Pst*I.

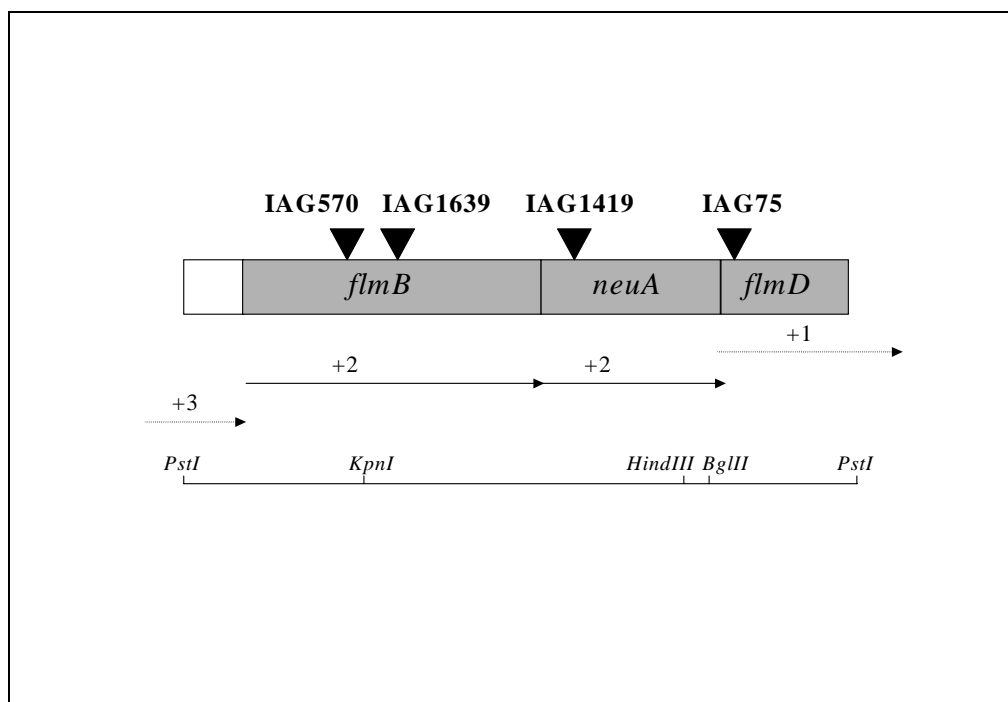


Figura 3.A.2. Fragmento de restricción *Pst*I clonado en pUC18 que contiene los lugares de inserción de los mutantes de Sch3N. Los potenciales genes fueron llamados como a sus homólogos en otras especies bacterianas. Los triángulos indican el lugar de inserción en el genoma de cada uno de los mutantes. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+1, +2, +3), de forma discontinua si la secuencia del gen está incompleta.

Lugar de inserción en el mutante IAG75

La secuencia nucleotídica obtenida desde los extremos del vector pUC18, que contenía la banda de amplificación clonada a partir del mutante IAG75, y comparada con las bases de datos de ADN y proteínas mostró que la proteína codificada por el gen truncado mostraba similitud con proteínas para el ensamblaje del filamento flagelar así como con proteínas para la síntesis de polisacáridos. Dicha proteína recibió por homología el nombre de FlmD.

Lugar de inserción en el mutante IAG570

En el caso de la secuencia obtenida a partir del mutante IAG570 la similitud en las bases de datos la relacionó con una proteína con la misma función definida en el caso anterior, concretamente se le denominó FlmB.

Lugar de inserción en el mutante IAG1419

Para el mutante IAG1419 se encontró que la inserción del transposón se encontraba en proteínas que codifican para la síntesis de una CMP-NeuNAc sintetasa principalmente; por homología se le denominó NeuA.

Lugar de inserción en el mutante IAG1639

En el caso del mutante IAG1639, la similitud de su secuencia interrumpida coincidió con la misma proteína que en el mutante IAG570, es decir FlmB, cuya función, ya descrita, estaba relacionada con el ensamblaje del filamento flagelar así como con proteínas para la síntesis de polisacáridos.

3.A.1.4 Clonaje del locus afectado por los mutantes**3.A.1.4.1 Obtención de sondas específicas**

A partir de la secuencia nucleotídica obtenida de los fragmentos adyacentes al lugar de inserción del mini-Tn5 de los mutantes, pudimos diseñar cebadores específicos para los genes mutados, concretamente FLMB3 y FMLD1. La PCR se llevó a cabo a 58°C (hibridación ADN/cebador) y con 1 minuto 15 segundos de extensión; el producto de amplificación de éstos (1122 pb) se marcó con digoxigenina tal como se describe en Material y Métodos para usarlo como sonda.

3.A.1.4.2 Hibridación de la librería genómica

Con la sonda obtenida se procedió al estudio de una librería genómica de la cepa Sch3N clonada en pUC18 *HindIII* y mantenida en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Dicho estudio se realizó mediante colony blot (ver Material y Métodos). Como control positivo se

utilizó la propia cepa de *A. caviae* sobre la cual se había construido la librería, Sch3N, y como control negativo la cepa XL1-Blue de *E. coli*.

Tras el revelado de la hibridación se obtuvieron dos clones que reaccionaron de manera positiva con la sonda.

Para confirmar el resultado obtenido, se aisló el ADN plasmídico de ambos clones y se comprobó mediante PCR que las bandas amplificadas correspondieran al tamaño esperado con los cebadores FLMB3 y FLMD1, 1122 pb. También en la PCR se emplearon controles, el ADN genómico de Sch3N como control positivo y ADN plasmídico de pUC18 como control negativo.

3.A.1.4.3 Obtención de los clones pDI2211, pDI284 y pDI54

De la digestión *Hind*III de ambos clones se dedujo el tamaño del fragmento genómico de la cepa salvaje que contenía cada uno de ellos, 2,237 y 2,830 pb respectivamente, que se clonaron de manera conjunta y por separado en el plásmido pDSK519, para dar lugar a los clones pDI2211 (2,237 pb de inserto), pDI284 (2,830 pb de inserto) y pDI54 (5,067 pb de inserto) respectivamente. Estos clones los mantuvimos en la cepa de *E. coli* S17-1.

3.A.1.4.4 Secuenciación del clon pDI54

El clon pDI54 fue secuenciado usando de punto de partida los oligonucleótidos cebadores complementarios a las secuencias ya obtenidas anteriormente de los fragmentos flanqueantes del mini-Tn5. De los tramos de secuencia obtenidos sobre una de las cadenas, se diseñaron nuevos cebadores, lo más distales al punto de inicio, de manera que permitieran continuar el avance a lo largo del ADN, alejándose del punto de inicio en ambas cadenas. De este modo la secuenciación se llevó a cabo de manera progresiva en ambas direcciones. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se pueden encontrar en Material y Métodos.

Una vez obtenida la secuencia, se procedió al análisis preliminar de la misma. Se detectaron las posibles pautas de lectura abierta (ORFs) en función de la presencia de los codones de inicio (ATG o GTG) y de terminación (TAA, TAG, TGA) y se descartaron inicialmente todas las pautas de menos de 100 pb. Se consideraron de este modo 5 ORFs potencialmente significativas (la primera de ellas incompleta) y sus productos de traducción fueron sometidos a una comparación frente a diferentes bases de datos de secuencias de ADN o proteínas para localizar aquellas que mostraran similitud con genes previamente descritos. Además se buscaron putativos promotores delante de cada una de las ORFs sin resultado alguno, lo que sugería que las 5 ORFs pertenecerían a un

mismo operón. También se localizaron antes de cada uno de los codones de inicio las posibles secuencias Shine-Dalgarno.

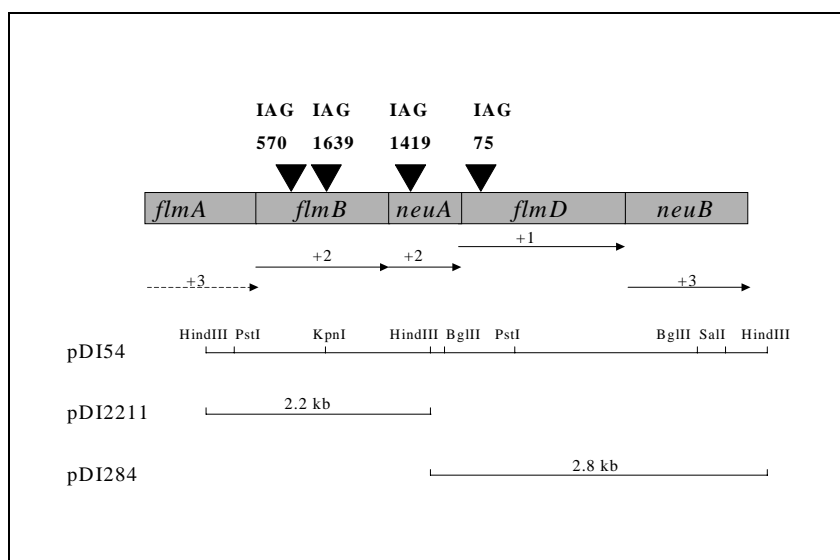


Figura 3.A.3 Organización genética del locus clonado de *A. caviae* Sch3N. Las potenciales ORFs fueron llamadas como a sus homólogas en otras especies bacterianas. Los triángulos indican el lugar de inserción en el genoma de cada uno de los mutantes. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+1, +2, +3), de forma discontinua si la secuencia del gen está incompleta.

3.A.1.4.5 Secuencia nucleotídica completa y análisis de la misma

```

1   AAGCTTGTGC GCCGATCAAT CTTTATGGAG CGACAAAGCT GACCTCTGAC
51  AAGTTGTTTA CAGCAGCAAA TAATATCAAA GGTTTCGCGAA ATATAAGATT
101 CAGTGTAGTT CGCTATGGAA ATGTAATGGG GTCTCGGGGT TCTGTAATAC
151 CATTTTCTT  GAAAAAACGT GCTGAGGGTG TGTTGCCGAT CACCCATGAA
201 GAAATGACAC GTTTTAATAT TTTCACTGCAG GATGGTGTTA ATATGGTGAT
251 GTATGCTCTG GAGCATCATC TCGGTGGTGA GATTTTTGTG CCAAAAATCC
301 CATCATATCG TATTTTAGAT ATAGCAACAG CAATATCTCC TGAATGCAAG
351 ACGAAGGTAG TTGGTATTCG TCCAGGAGAA AAGCTGCATG AAGAGATGAT
401 TACAGATACC GATTCATTGA ACACAATTGA TTTGGGCCGC TATTACGCAA
451 TTTTACCTTC TGTGTCATTC AATCATACAG AAGAAGACTA TATTAAGCAT
501 CATAGTGCCG TAAAAGTACC GTTTGGTTTC AAATATAACT CAGGTACTAA
551 CACTGAGTGG GAGACCGTGG AGTCTCTGCG GGAATTGATA AAAACTCATG
601 TAGATGCCAA CTTTGAAGTG TGAGATAAAA CGTGATTCCA TACGGTAAAC

```

651 AAGAGATCAC CCAGCAAGAT ATTGATGGCG TGGTTGCGGT GTTACAATCT
 701 GATTTTCTAA CTCAGGGACC AAAAGTCCCT GAATTTGAAA AATATTTAAC
 751 AACCCTACTT GGCGCAGCGT ATGCGTTGGC TGTAATAAGT GCTACTTCGG
 801 CACTACACAT TGCCTGTTTG GCTTTGGGTC TTGGTCCTGG CGATTTTTTA
 851 TGGACAAGCC CAGTTACTTT TGTTCATCA GCAAATTGCG GTTTGTATTG
 901 TGGCGCCAAA GTCGATTTTG TACATATAGA TCCAGATACA TATAATCTGT
 951 GTCCGAAGCA ATTGGAGAAA AAGCTAATTG CAGCTAATGC CAACGGTACC
 1001 TTACCCAAGA TAGTCGTTCC TGTTCAATTA TGTGGCCAAC CTTGTGACAT
 1051 GGAAGCGATT TCCCGTCTGG CAACTGAATA TGGCTTTAAA GTTATCGAGG
 1101 ATGCATCACA TGCTATCGGC GGTAGTTATT TAAACGAACC CATTGGCAAT
 1151 TGTCGATACA GCGACATTAC GGTATTTAGT TTCCATCCGG TTAATAATTAT
 1201 CACTACTGCT GAAGGTGGCG CAGTGGTAAC TAACCAAAAA GATTTAGCTG
 1251 ATAAAATGGC CTTGTTACGT AGCCATGGTA TCACCCGTGA TATCGAGCAG
 1301 ATGAAAGGCG AAAGTCATGG TGGTTGGTAT TATCAACAGA TTGACTTGGG
 1351 CTTTAACTAC CGAATGACCG AGTTACAAGC TGCATTAGGG ATCACCCAAA
 1401 TACAACGCCT TGATGAATTT ATCGCTGCTC GTCATCGCTT GGCTGACCGT
 1451 TATAACAGAC TTTTGAAGCG GTTACCGATA GTCTTACCAT TCCAGTTAGA
 1501 AAATACCCAT TCCGGATTGC ATCTTTACGT TATACGACTT CAGCTTAATA
 1551 ATATTTTATT AACGCACCGA GAGGTTTTTG AAGCGTTACG TGAAAATGGT
 1601 ATCGGGGTGA ATGTTCATTA CATACTGTA CATAACAGC CTTATTACGA
 1651 AGATATGGGA TTCAAATCTG GTGATTTTCC TGAGGCAGAG CAATATTATC
 1701 GTGAAGCTAT TTCTTTGCCG ATGTTCCACG GCATGACAGA AGAGCAGCAA
 1751 GATAAAGTAG TATGCGTATT GTCTGAGATA TTGGAAGGGA AATAAATGAA
 1801 TATTGCCATC ATCCCTGCCC GTGGTGGCAG TAAGCGTATT CCTAGGAAAA
 1851 ATATCAAACC ATTTCATAGC AAGCCCATGA TCGCATGGTC CATCTTAGCT
 1901 GCTAAGAAGG CTGGTTGTTT TGAACGTATA ATTGTTTCAA CCGATGATGC
 1951 TGAAATTGCT GCTGTTGCAC TCGAATATGG TGCTGAAGTG CCATTTACTC
 2001 GCCCGGCAGA GATTGCTAAC GATTATGCCA CTAAGGTGTA GGTGATAAGC
 2051 CATGCCATTA ATTGGTTGAT AAATCAGCAA GGGCAAGTGC CGGAAAACGT
 2101 ATGCTGCCTC TATGCAACAG CACCTTTTGT TGAGCCTGAT GATTTATGCC
 2151 AGGGATTAGA ATTGTAAACG TTCAACAAGG AATGCCAATT TGTTTTTCAGT

2201 GCTACTCGCT TTTCGTTTCC GATTCAACGC GCTATCAAGC TTGATGAGTC
 2251 AGGTTGGGTG AGTATGTTTC ATCCCGAGTA TCAACTAACT CGTTCCCAAG
 2301 ATCTGGAGGA AGCCTACCAT GATGCGGGGC AATTTTATTG GGGAAAGGCT
 2351 AATGCTTGGC TTAATAAAAT ACCTATATTT GCCGTGCATA CACAGGTAGT
 2401 TCTATTACCC AGCCACAGGG TGCAAGATAT TGATACTCAG GATGATTGGC
 2451 TGCGTGCTGA GAAGCTATTT ACGCTAAGGT **AATAGCCATG** AAGTTTTTTA
 2501 TTCGCACCGA TGCATCACGT TGGATAGGTT CCGGCCATGT AATGCGCTGC
 2551 CTAATGCTAG CCGATGGCTT AAAATCGGCA GGTCATCAGG TAACATTTAT
 2601 TTGTAGACCG CAAGATGGTG ATTTGCTCGA TTTGATTGCT GCGCGTAACC
 2651 ATAATCTGCT TGCCTTGCCA TCTCTGACAA CTGTTATCAG ACCTGAGCAT
 2701 GGGGCTGATT ATTCTTCTTG GTTGCAAGTG CCATGGCAAC AAGACGCTGC
 2751 AGATGTTTTA GAAAGTGTGG TATACGCTGA CTGGCTGATA GTTGATCATT
 2801 ATGGAATTAA TGCTCAGTGG GAACGGGAAA TAAGGCTGTC GTTAAATTGT
 2851 AAAGTTTTGT CTATCGATGA TCTGGTGCGC CCCCATGATG CTGATTTGAT
 2901 TCTGGATCAA ACGCTTGACC GCACTCCGGA GGCCTATTTT GAGTGTTTTA
 2951 ATATATCAGA CAAGCAGCCT GTAGTATTAA GTGGAGTTGC ATACGCCTTG
 3001 CTGTCTTCAC AATTTGAAAA AATAAGAAAT CAGGGGATAC TACGAGCCCC
 3051 TGCCAGTCGT CAGCCTAGGA TTTTACTCTC CTTTGGTGGT ATTGATGAGC
 3101 CAAATGTGAC GCTAAGAGTA CTTAAGGCGT TAAGTGAGTT TAATGCTGTA
 3151 TTTACCGTGC TGTTAAGCCC TCGAGCACCA CACTATCAAG CAGTGAAAAC
 3201 GTGGTGTGAT GATCGTGTTA ATGTTGTTCA TCATGATTTT ATACAAGATA
 3251 TGGCAACCTT GATGAGCGAG CACGATCTGG CCATCGGTGC TCCAGGGACA
 3301 ACCACTTGGG AGCGAGCCTG TCTGGGATTA CCAAATATAG TAATTCCGAT
 3351 AGCAGAAAAAC CAACAGGCCA TTTGCCAAGC ATTGTTGGCA CATCAAGCTG
 3401 CTTTATTAGT ACAACAGTCT GATATTGAAA GTAGATTAAT CCCTGCACTG
 3451 CATGACTTGT TGAATAATTA TAAAGAATAC GTAGATAATA ATCTCGAGTT
 3501 GTGTGATGGC AAGGGGGTGC AACGAGTCAT TAATACTATT ATGGCTAATA
 3551 CAGAAATATC AGGATTTAGG CTAAGGCCGG TATCAATCGA TGATACTCTA
 3601 CTGATTTATC AGTGGCAATC TGATCCAATA ACCAGACGTT ATGCGCTTAA
 3651 TCCCAATCCC CCTAGTTGGG TAGAGCACAA AAGCTGGATG GAAAAAAAAA

```

3701  TACAGTGCCA GCAAGATTAT TTCTTTTTGA TAATTAATGC TGAAAGTAGC
3751  GAACCCTGTG GTGCAGTTAG ACTAGATGAA CTAGGTACTG ACAATTACCT
3801  TATCTCAATT TTTGTTGCTC CTAATAAGCA TGGTCAGGGT ATTGGATTAA
3851  CAGGTTTGAA ATTACTTGAT AGATGCCTAC CAAAAATCAG GATTCATGCC
3901  ACAGTACTGA CCGAAAATAT AGCATCGCAG CGCCTTTTTT CTAACGCTGG
3951  CTACCAGCAG GTAGCGCCAG ATAAATTTAT AAGAGAACCA TTATGGACAA
4001  AATAATCAAG CCGTTTATTA CCATCAATGG CCGCAAGATT GGCCCTGACT
4051  ATCCACCATA TATTATTGCG GAACTCTCCG CTAACCACAA TGGTGATATC
4101  AATCGTGCTT TTGCGATCAT GGAAGAGGCA AAAAAAGCGG GCGCAGATGC
4151  AATAAACTT CAAACATATA CCGCAGACAC TATTACTTTT GAATGTGATA
4201  GTGAGGAATT TCAAATTCAC GGTGGGCTAT GGGATGGTAA AAATTTGTAC
4251  CAACTTTACA AAGAGGCCCA AATGCCATGG GAGTGGCACC AACCGTTGTT
4301  TGAGAAAGCC AAAGAGTTGG GGATCACCAT CTTCAGTTCT CCTTTTGACT
4351  TTA CTGCTGT TGATTTGTTG GAAGATCTTG ACGCACCAGC CTACAAGATA
4401  GCGTCTTTTG AGTTGATAGA TTTGCCATTG ATAAAACGTG TGGCGCAAAC
4451  AGGTAAGCCA ATGATCATGT CTACCGGCAT GGCCAATGCG GAAGAGATTG
4501  CCGAAGCGAT TGCTACTGCC CAGTCCAATG GTTGCCAAGA GTTGGTCGTG
4551  TTGCACTGTG TCAGCGGTTA TCCTGCGCCG GCGGATCAAT ACAATCTGCG
4601  GACCATTGCC GATATGGCTG AGCGTTTTGG TGTGCTATCT GGCTTGCTCTG
4651  ATCACACTAT CGATAATGCC ACCGCTGTGG CCGCGGTAGC CTTGGGGGCT
4701  TGTTTAATCG AAAAGCATGT CACCATGGAT AGAAATGGCG GGGGCGCTGA
4751  TGATAGCTTC TCGCTCGAAC CTCATGAGCT TGCTGCGTTA TGTAAGATG
4801  CTAAACTGCT TTGGTCAGCA TTAGGCAGCG TAAATTATAC GCGTACTGAA
4851  GCCGAAAAG GAAATGTCAA ATTTCGGCGT TCTCTATATG TGATACGAGA
4901  CATTAAAGCT GGGGATGTAT TAAGTAATGA TAATGTGCGT AGCATTAGGC
4951  CCGGATTTGG TTTGGCTCCG AAGTATTTAG AGCAAGTCCT TGGCAAAACG
5001  GCTATAGTTG ATATTAAACG CGGAACCTCCG TTATCATTTG AATTTATTTA
5051  AGAAGGTGGT GAAGCTT

```

Figura 3.A.4 Secuencia nucleotídica contenida en el plásmido pDI54. Los codones de inicio así como los codones de parada de las cinco pautas de lectura abierta establecidas se han marcado subrayando y en negrita respectivamente.

Todas las ORFs se transcriben en la misma dirección y existe una mínima distancia entre ellas.

Las principales características de cada una de las ORFs se pueden resumir en la tabla 3.A.3, así como su localización en la secuencia nucleotídica de la figura 3.A.4.

| ORF | Posición | %G+C | Proteína codificada | | pI ^a | GRAVY ^b |
|-------|-----------|------|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | aa | KDa ^a | | |
| ORF-1 | 1-623i | - | 206 | - | - | - |
| ORF-2 | 632-1795 | 35,1 | 387 | 43,091 | 5,66 | -0,107 |
| ORF-3 | 1796-2482 | 38,4 | 228 | 25,813 | 5,69 | -0,134 |
| ORF-4 | 2488-4005 | 34,2 | 505 | 56,874 | 5,76 | -0,092 |
| ORF-5 | 3993-5051 | 42,2 | 352 | 38,597 | 5,07 | -0,122 |

Tabla 3.A.3 Principales características de las 5 ORFs localizadas en la secuencia nucleotídica y su ubicación en la misma.

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de Expasy.

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle, (1982).

i: ORF incompleta.

3.A.1.4.6 Análisis de las diferentes ORFs

ORF1

Sólo contábamos con los 623 nucleótidos situados en 3' de la secuencia de la ORF1, localizada anteriormente a las siguientes 4 ORFs. Aun así, detallamos a continuación las proteínas que mostraron mayor homología con el producto de traducción de la ORF1, que fueron FlaA1 de *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997), con un porcentaje de similaridad del 61% y de identidad del 45%; FlmA de *Caulobacter crescentus* (Lecrerc y col., 1998), con un 57% de similaridad y un 42% de identidad y SpsD de *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996) con un porcentaje de similaridad del 60% y de identidad del 39%.

FlmA está implicada en el ensamblaje del filamento flagelar de *C. crescentus*, a través de la modificación de la flagelina u otras proteínas flagelares, además proteínas homólogas de la misma se han incluido en un sistema general de glicosilación de

proteínas de *Campylobacter jejuni* (Szymanski y col., 1999). Tanto FlmA como FlaA1, están incluidas en la subfamilia 2 WbpM de *Pseudomonas aeruginosa*, consistente en un gran grupo de proteínas con diversas funciones envueltas en la biosíntesis de exopolisacárido (Burrows y col., 2000). La función enzimática de FlaA1 de *H. pylori* consistiría en una bifuncional UDP-glc-C6 deshidratasa/C4 reductasa que por complementación se puede extrapolar a otras proteínas de la familia (Creuzenet y col., 2000). SpsD es una proteína hipotética cuya función en la biosíntesis del polisacárido de la espina se conoce únicamente por homología.

Tal como indicamos previamente, se denominó FlmA a la ORF1.

```
ACAPINLYGATKLTSDKLFATAANNIKGSRNIRFSVVRVGNVMGSRGSPVFPFLKKRAEGV
LPITHEEMTRFNISLQDGVNMVMYALEHHLGGEIFVVKIPSYRILDIATAISPECKTKVV
GIRPGEKLHEEMITDSDLNTIDLGRYYAILPSVSFNHTEEDYIKHHSVAVKVPFGFKYNS
GTNTEWETVESLRELKTHVDANFEV
```

Figura 3.A.5 Secuencia traducida en aminoácidos de FlmA de *A. caviae* (incompleta).

ORF2

En los 8 nucleótidos posteriores al codón de parada de FlmA, encontramos la ORF2, que comienza con el codón de inicio alternativo GTG para codificar un producto de 387 aminoácidos, el cual muestra homología principalmente con FlmB de *Caulobacter crescentus* (Lecrerc y col., 1998) con un porcentaje de similaridad del 57% y de identidad del 40%; SpsC de *Bacillus subtilis* (Kunst y col., 1997), con un 59% de similaridad y un 38% de identidad y SpsC de *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996) con un porcentaje de similaridad del 60% y de identidad del 36%.

FlmB está ubicado en el mismo operón de *C. crescentus* que FlmA, y también se cree que es necesario para el ensamblaje del filamento flagelar. La proteína homóloga de *Campylobacter jejuni* (PglE) pertenece también al sistema de glicosilación general de proteínas (Szymanski y col., 1999).

SpsC tanto en *Bacillus subtilis* como en *Methanococcus jannaschii* es una proteína hipotética relacionada con la biosíntesis del polisacárido de la espina.

Las inserciones del mini-Tn5 en los mutantes IAG570 e IAG1639 localizadas en la ORF2 se encuentran concretamente entre los nucleótidos 1002-1003 y 1222-1223 (Figura 3.A.4) respectivamente.

Tal como indicamos previamente, se denominó FlmB a la ORF2.

MIPYGKQEITQQDIDGVVAVLQSDFLTQGPKEPEFEKYLTTHTGAAYALAVNSATSALHI
 ACLALGLGPGDFLWTSPVTFVASANGLYCGAKVDFVHIDPDYNLCPKQLEKKLIAANA
 NGTLPKIVVPVHLCGQPCDMEAISRLATEYGFVKVIEDASHAIGGSYLNPIGNCRYSIT
 VFSFHPVKIITTAEGGAVVTNOKDLADKMALLRSHGITRDIEQMKGESHGWWYQQIDL
 FNYRMTELQAALGITQIQRLDEFIAARHRLADRYNRLKRLPIVLPFQLENTHSGLHLYV
 IRLQLNNISLTHREVFEALRENGIGVNVHYIPVHTQPYEDMGFKSGDFPEAEQYYREAI
 SLPMFHHGMTEEQQDKVVCVLSEILEGK

Figura 3.A.6 Secuencia traducida en aminoácidos de FlmB de *A. caviae*

ORF3

Inmediatamente a continuación de FlmB y transcrito en la misma pauta de lectura encontramos la ORF3 cuyo producto es de 228 aminoácidos. Ésta muestra homología principalmente con NeuA de *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997) con un porcentaje de similaridad del 53% y de identidad del 37%; NeuA de *Escherichia coli* (Zapata y col., 1989), con un 50% de similaridad y un 31% de identidad y NeuA de *Neisseria meningitidis* (Edwards y col., 1994) con un porcentaje de similaridad del 45% y de identidad del 27%.

NeuA es una proteína con función CMP-NeuNAc sintetasa, necesaria para la condensación del ácido N-acetilneurámico (NeuNAc) y el CTP en CMP-NeuNAc. Dicho enzima se necesita para la síntesis de las cápsulas de ácido polisialico de *E. coli* K1 (Zapata y col., 1989) y *N. meningitidis* tipo b (Edwards y col., 1994).

Una cuarta proteína homóloga con idéntica identidad y similaridad que la correspondiente a NeuA de *N. meningitidis* se corresponde con la proteína PtmB de *Campylobacter coli* VC0167, cuya función es requerida en la sialización de las flagelinas polares (Guerry y col., 1996).

La inserción del mini-Tn5 en el mutante IAG1419, localizada en la ORF3, se encuentra al comienzo de la secuencia 5', entre los nucleótidos 1888-1889 (Figura 3.A.4).

Tal como indicamos previamente, se denominó NeuA a la ORF3.

MNIAIIPARGGSKRIPRKNIPFHSKPMIAWSILAACKAGCFERIIIVSTDDAEIAVALE
 YGAEVPFTRPAEIANDYATTGEVISHAINWLNQQGQVPENVCCLYATAPFVEPDDLCQG
 LELLTFNKECQFVFSATRFSPFIQRAIKLDESGWVSMFHPEYQLTRSQDLEAEYHDAGQF
 YWGKANAWLNKLPFAVHTQVVLLPSHRVQDIDTQDDWLRAEKLFTLR

Figura 3.A.7 Secuencia traducida en aminoácidos de NeuA de *A. caviae*

ORF4

En los 6 nucleótidos posteriores al codón de parada de NeuA, encontramos la ORF4 y codifica una putativa proteína de 505 aminoácidos, transcrita en diferente pauta de lectura, la cual muestra sus más altas homologías con FlmD de *Caulobacter*

crescentus (Lecrerc y col., 1998) con un porcentaje de similaridad del 40% y de identidad del 27%; SpsG de *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996), con un 41% de similaridad y un 24% de identidad y SpsH de *Bacillus subtilis* (Kunst y col., 1997) con un porcentaje de similaridad del 40% y de identidad del 23%.

FlmD es de nuevo una proteína necesaria en el ensamblaje del filamento flagelar de *C. crescentus* aunque se encuentra mapada junto a FlmC en un operón diferente al que contiene FlmA y FlmB respectivamente (Lecrerc y col., 1998).

SpsG de *Methanococcus jannaschii* y SpsH de *Bacillus subtilis* son proteínas hipotéticas relacionadas con la biosíntesis del polisacárido de la espota.

La inserción del mini-Tn5 en el mutante IAG75 se localiza entre los nucleótidos 2549 y 2550 (Figura 3.A.4), pertenecientes al extremo 5' de la ORF4.

Tal como indicamos previamente, se denominó FlmD a la ORF4.

```
MKFFIRTDASRWIGSGHVMRCLMLADGLKSAGHQVTFICRPQDGDLLDLIAARNHNLAL  
PSLTTVIRPEHGADYSSWLQVPWQQDAADVLESVVYADWLIVDHYGINAQWEREIRLSLN  
CKVLSIDDLVRPHDADLILDQTLDRTPAYFECFNISDKQPVVLSGVAYALLSSQFGKIR  
NQGILRAPASRQPRILLSFGGIDEPNVTLRVLKALSEFNAVFTVLLSPRAPHYQAVKTWC  
DDRVNVVHHDFIQDMATLMSEHDLAIGAPGTTTWERACLGLPNIVIPIAENQQAICQALL  
AHQAALLVQQSDIESRLIPALHDLNNYKEYVDNNLELCDGKGVQRVINTIMANTEISGF  
RLRPVSIDDTLLIYQWQSDPITRRYALNPNPSSWVEHKSWMEKKIQCCQDYFFLIINAES  
SEPCGAVRLDELGTDNYLISIFVAPNKHGQGIGLTGLKLLDRCLPKIRIHATVLTENIAS  
QRLFSNAGYQQVAPDKFIREPLWTK
```

Figura 3.A.8 Secuencia traducida en aminoácidos de FlmD de *A. caviae*

ORF5

El codón de inicio de la ORF5 se encuentra 13 nucleótidos superpuesto en la secuencia de la ORF4, transcribiéndose en diferente pauta de lectura y codificando para una putativa proteína de 352 aminoácidos cuya homología principalmente coincide con NeuB de *Campylobacter jejuni* (Parkhill y col., 2000) con un porcentaje de similaridad del 55% y de identidad del 40%; SpsE de *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997), con un 59% de similaridad y un 39% de identidad y SpsE de *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996) con un porcentaje de similaridad del 53% y de identidad del 36%.

Además de la mencionada homología con NeuB de *C. jejuni*, también existe homología con NeuB de otras especies, proteína con función sintetasa de ácido siálico. En Linton y col., (2000) podemos ver que dicha proteína se relaciona con la movilidad y la producción del flagelo.

SpsE, tanto de *H. pylori* como de *Methanococcus jannaschii* y otras especies es una proteína hipotética relacionada con la biosíntesis del polisacárido de la espota.

Tal como indicamos previamente, se denominó NeuB a la ORF5.

```
MDKIIKPFITINGRKIGPDYPPYIIAELSANHNGDINRAFAIMEEAKKAGADAIAKLQTYT
ADTITFECDSEEFQIHGGLWDGKNLYQLYKEAQMPWEWHQPLFEKAKELGITIFSSPFD
TAVDLLEDLDAPAYKIASFELIDLPLIKRVAQTGKPMIMSTGMAEIEIAEAIATAQSNG
CQELVVLHCVSGYPAPADQYNLRTIADMAERFGVLSGLSDHTIDNATAVAVALGACLIE
KHVTMDRNGGGADDSFSLEPHELAALCKDAKTAWSSALGSVNYTRTEAEKGNVKFRRSLYV
IRDIKAGDVLSDNDNVR SIRPGFGLAPKYLEQVLGKTAIVDIKRGTPLSFEFI
```

Figura 3.A.9 Secuencia traducida en aminoácidos de NeuB de *A. caviae*

3.A.1.5 Análisis del LPS por SDS-PAGE

Los resultados de las homologías obtenidas en las bases de datos sugerían la posibilidad de que los mutantes pudiesen tener defectos en la biosíntesis de polisacárido, lo que se investigó examinando el lipopolisacárido de los mismos, ya que *A. caviae* Sch3N no produce ni cápsula ni esporas.

Se extrajo el LPS de la cepa Sch3N y de los cuatro mutantes, IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639, partiendo de cultivos en caldo BHI e incubados a 37°C durante toda la noche. Este LPS se analizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) tal y como se describe en Material y Métodos. El resultado puede observarse en la Figura 3.A.10-A, que muestra el LPS “smooth” para la cepa parental a diferencia del lipopolisacárido carente de Ag-O (“rough”) en los mutantes. Además, el mismo LPS se analizó en geles de Tris-Tricina para el estudio del perfil electroforético de bajo peso molecular (ver Material y Métodos), mostrando un bandeado doble en la cepa parental y simple en los 4 mutantes (Figura 3.A.10-B). La banda que no aparece en los mutantes podría corresponderse con el núcleo externo del LPS.

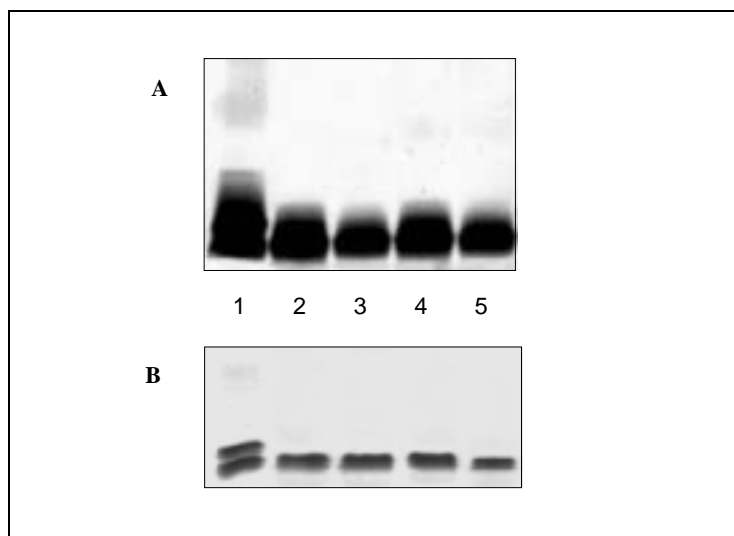


Figura 3.A.10 Análisis del LPS aislado en *A. caviae* Sch3N (línea 1) y los 4 mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 (líneas 2, 3, 4 y 5 respectivamente). (A) LPS analizado en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12%); (B) El mismo LPS analizado en geles de Tris-Tricina.

3.A.1.6 Complementación de los mutantes con los plásmidos pDI2211, pDI284 y pDI54

Los plásmidos pDI2211, pDI284 y pDI54 que contienen fragmentos de 2,237, 2,830 y 5,067 kb respectivamente del ADN genómico de Sch3N, en los cuales se encuentran las copias salvajes de los genes mutados (Figura 3.A.3), se mantenían en la cepa S17-1 de *E. coli*, desde la cual se introdujeron mediante conjugación triparental a cada uno de los cuatro mutantes: IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639. Se seleccionaron aquellos transconjugantes capaces de crecer en placas de TSA suplementadas con ácido nalidíxico, cloranfenicol y kanamicina, de los que se seleccionaron uno de cada una de las doce conjugaciones, tras asegurar que cada uno de éstos era positivo para el reactivo de la oxidasa.

Se obtuvo ADN plasmídico de cada uno de los 12 seleccionados para corroborar mediante los patrones de restricción con las endonucleasas *Hind*III y *Pst*I, que los plásmidos extraídos de cada mutante de *Aeromonas* eran aquellos que manteníamos en *E. coli* S17-1. Tras confirmarlo, procedimos a los ensayos fenotípicos que nos indicarían si la expresión en *trans* de los genes salvajes, obtenida a partir de los plásmidos, nos proporcionaría la recuperación del fenotipo de Sch3N para cada mutante.

3.A.1.6.1 Adhesión de los transconjugantes respecto a los mutantes

Realizamos los respectivos ensayos de adhesión a células HEp-2 en los doce transconjugantes y haciendo uso de Sch3N como control positivo y los mutantes no adherentes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 como controles negativos.

Los resultados mostraron un importante incremento de la adhesión en los cuatro mutantes cuando estos llevaban el plásmido pDI54 (*flmB*⁺ *neuA*⁺ *flmD*⁺ *neuB*⁺) con valores medios de adhesión de entre 12 a 17 bacterias adheridas/célula HEp-2. Lo mismo ocurría en el mutante IAG75 llevando el plásmido pDI284 (*flmD*⁺ *neuB*⁺) con un valor medio de 15 bacterias adheridas/célula HEp-2.

Por el contrario, los cuatro mutantes llevando el plásmido pDI2211 (*flmB*⁺) permanecían no adherentes, con valores medios de adhesión de entre 0,5 y 3 bacterias adheridas/célula HEp-2. O los mutantes IAG570 e IAG1419 con el plásmido pDI284 (*flmD*⁺ *neuB*⁺) que tampoco recuperaban el fenotipo salvaje, con valores medios de adhesión de entre 0,6 a 0,9 bacterias adheridas/célula HEp-2.

| Cepa o plásmido y mutante | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 \pm SD |
|---|---|
| Sch3N | 17,4 \pm 11,3 |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | 2,1 \pm 1 |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | 1,3 \pm 0,5 |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | 1,1 \pm 0,5 |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | 3,3 \pm 1,3 |
| PDI2211 (<i>flmB</i> ⁺) | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | 1,6 \pm 0,6 |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | 1,5 \pm 0,6 |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | 0,5 \pm 0,2 |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | 3 \pm 1,3 |
| PDI284 (<i>flmD</i> ⁺ <i>neuB</i> ⁺) | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | 15 \pm 10,4 |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | 0,7 \pm 0,3 |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | 0,9 \pm 0,5 |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | 0,6 \pm 0,4 |
| PDI54 (<i>flmB</i> ⁺ <i>neuA</i> ⁺ <i>flmD</i> ⁺ <i>neuB</i> ⁺) | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | 11,9 \pm 5 |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | 16,7 \pm 7,8 |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | 17 \pm 4,4 |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | 14,1 \pm 3,6 |

Tabla 3.A.4 Adhesión de los mutantes de *A. caviae* Sch3N originales y complementados.

3.A.1.6.2 Movilidad y expresión de flagelina de los transconjugantes

Se prepararon placas de agar semisólido (0,25% agar) para observar la movilidad de los transconjugantes junto al control positivo, Sch3N, y los controles negativos, mutantes no móviles IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639, suplementando el medio con los antibióticos adecuados en cada caso. Las placas se incubaron boca arriba a 37°C. A las 24 horas de incubación, todos los mutantes que expresaban el plásmido pDI54 habían recuperado la capacidad de moverse en agar semisólido, así como el mutante IAG75 con el plásmido pDI284. El resto de transconjugantes continuaban inmóviles.

Para confirmar estos resultados se hizo una extracción de proteínas totales de las mismas cepas. Las proteínas se obtuvieron tras el crecimiento de las células en caldo BHI a 37°C durante 16 horas y se procedió a la realización del inmunoblot tal y como se describe en Material y Métodos con anticuerpo anti-flagelina polar (1:500). Tras el revelado se detectó una banda de igual tamaño (flagelina polar) tanto en la cepa salvaje como en los transconjugantes que habían resultado positivos para la movilidad en placa. En el resto de conjugantes no se detectó la proteína. (Figura 3.A.11)

| Cepa o plásmido y mutante | Movilidad | Flagelina polar |
|---|-----------|-----------------|
| Sch3N | + | + |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | - | - |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | - | - |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| PDI2211 (<i>flmB</i> ⁺) | | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | - | - |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | - | - |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| PDI284 (<i>flmD</i> ⁺ <i>neuB</i> ⁺) | | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | + | + |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | - | - |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | - | - |
| PDI54 (<i>flmB</i> ⁺ <i>neuA</i> ⁺ <i>flmD</i> ⁺ <i>neuB</i> ⁺) | | |
| IAG75 (<i>flmD</i> ⁻) | + | + |
| IAG570 (<i>flmB</i> ⁻) | + | + |
| IAG1419 (<i>neuA</i> ⁻) | + | + |
| IAG1639 (<i>flmB</i> ⁻) | + | + |

Tabla 3.A.5 Movilidad y presencia o ausencia de flagelina polar en los mutantes de *A. caviae* Sch3N originales y complementados.

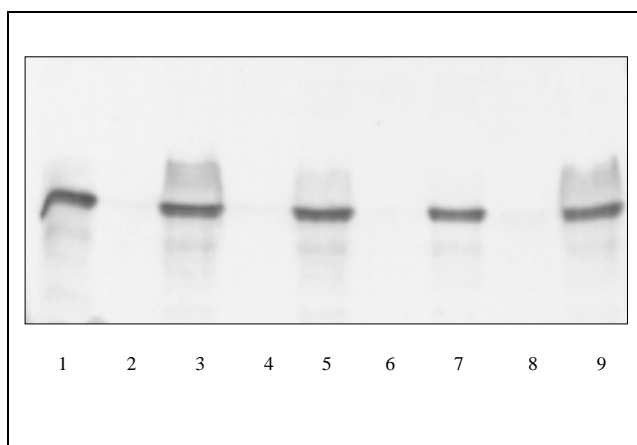


Figura 3.A.11 Inmunoblot para la identificación de flagelina polar en proteínas totales de Sch3N (línea 1), los mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 (líneas 2, 4, 6 y 8 respectivamente) y los conjugantes de cada mutante con el plásmido pDI54 (líneas 3, 5 7 y 9 respectivamente).

3.A.1.6.3 Análisis del LPS de los transconjugantes

Los cuatro mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 recuperaban tanto el Ag-O como la banda perteneciente al núcleo externo del LPS cuando llevaban el plásmido pDI54, así como el mutante IAG75 con el plásmido pDI284, siendo por lo tanto las mismas cepas que habían recuperado tanto la movilidad y la expresión de flagelina como la adhesión.

Por el contrario, el resto de cepas transconjugantes no mostraron diferencia alguna al contrastarlas con el mutante correspondiente. Concretamente, los cuatro mutantes con el plásmido pDI2211 y los mutantes IAG570, IAG1419 e IAG 1639 portando el plásmido pDI284.

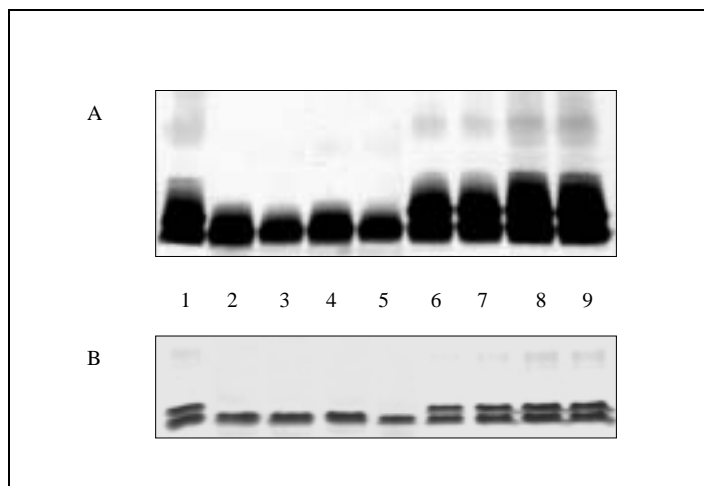


Figura 3.A.12 Análisis del LPS aislado en *A. caviae* Sch3N (línea 1), los 4 mutantes IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639 (líneas 2, 3, 4 y 5 respectivamente) y los mismos mutantes tras la complementación con el plásmido pDI54 (líneas 6, 7, 8 y 9) (A) LPS analizado en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12%); (B) El mismo LPS analizado en geles de Tris-Tricina.

3.A.1.7 Distribución de los genes *flmA*, *flmB*, *neuA*, *flmD* y *neuB* en *Aeromonas* mesófilas

3.A.1.7.1 Estudio mediante hibridación de ADN

Se prepararon 5 sondas marcadas con digoxigenina correspondientes a los cinco genes secuenciados en el locus *flm* de *A. caviae* Sch3N, concretamente *flmA*, *flmB*, *neuA*, *flmD* y *neuB*. Para ello se amplificaron los mismos con las parejas de cebadores, FLMA1-FLMA2, FLMB1-FLMB5, NEUA-NEUA3, FLMD2-FLMD5 y NEUB1-NEUB3, que se pueden encontrar el apartado de Material y Métodos. Las condiciones de PCR (T^a hibridación cebador/ADN y tiempo de extensión) empleadas en cada caso fueron, siguiendo el mismo orden que las parejas de cebadores, 58°C -30 segundos, 60°C -1 minuto, 56°C -45 segundos, 54°C -1 minuto 15 segundos y 58°C -45 segundos. Cada una de las sondas, de 423 pb, 968 pb, 673 pb, 1126 pb y 759 pb respectivamente, se empleó para hibridar mediante dot blot con 20 cepas de *Aeromonas* mesófilas entre las que se encontraban las especies *A. hydrophila*, *A. veronii* bv. *veronii* y *A. veronii* bv. *sobria*, y usando como control positivo la propia Sch3N. Todas las cepas estudiadas resultaron positivas para las sondas correspondientes a los genes *flmA* y *flmB*, mientras que el resto de sondas sólo hibridaban con el control positivo.

Adicionalmente se preparó una nueva sonda marcada con digoxigenina mediante la amplificación del fragmento de 2,998 pb correspondiente a la región que comprende *neuA-flmD-neuB* (sólo *flmD* estaba completo). Para ello se realizó una PCR con los cebadores NEUA y SAS, a una T^a de hibridación ADN/cebador de 52°C y con un tiempo de extensión de 3 minutos, en Sch3N. Esta sonda se empleó para estudiar mediante Southern blot 19 cepas de *A. caviae*, de las cuales sólo hibridó el control positivo Sch3N.

3.A.1.7.2 Generación de mutantes *flmB*⁻ en *Aeromonas* mesófilas

Dado que la cepa AH-3 de *A. hydrophila* reaccionaba al igual que el resto de *Aeromonas* spp. mesófilas con la sonda para *flmB*, se realizó una PCR con la pareja de cebadores FLMB2-FLMB4, a una T^a de hibridación ADN/cebador de 56°C y con un tiempo de extensión de 45 segundos, para amplificar un fragmento interno de la misma, paralelamente al control positivo, Sch3N. El fragmento amplificado en AH-3, de 672 pb al igual que en Sch3N, se ligó al vector pGEMTeasy a partir del cual se pudo confirmar mediante secuenciación, empleando los cebadores Sp6 y M13 for. Se recuperó el inserto mediante la digestión del vector pGEMTeasy-FlmB con la enzima de restricción *EcoRI*, para ligar posteriormente al plásmido suicida pSF100 digerido también con *EcoRI*. Se generó de este modo la construcción pSF100-FlmB, la cual se transformó en la cepa MC1061 de *E. coli* para posteriormente realizar una conjugación triparental con la cepa receptora *A. hydrophila* AH-3 Rif^r y de este modo obtener un mutante por inserción tal como se describe en Material y Métodos. Se seleccionaron aquellas colonias que poseían resistencia a rifampicina y a kanamicina tras plaquearlas en TSA suplementado con ambos antibióticos e incubar las mismas a 30°C durante toda la noche.

Paralelamente se utilizó la construcción pSF100-FlmB para generar mutantes en otras cepas de *Aeromonas* mesófilas concretamente *A. hydrophila* serogrupo O:3 y O:25, *A. veronii* bv. *sobria* AH-1 (serogrupo O:11) y *A. veronii* bv. *veronii* AS-28 (serogrupo O:11), todas ellas con resistencia espontánea a rifampicina. En todos los casos la selección se hizo igual que en AH-3.

De este modo se obtuvieron los mutantes AH-1726, AH-1881, AH-1882, AH-1883 y AH-1884.

3.A.1.7.3 Análisis de la movilidad, el LPS y la adhesión de los mutantes generados

Se sometieron a ensayos de movilidad, en placas al 0,25% de agar, los cinco mutantes *flmB*⁻ AH-1726, AH-1881, AH-1882, AH-1883 y AH-1884. Ninguno de ellos resultó móvil tras incubarlos a 30°C durante 48 horas, mientras que las respectivas cepas salvajes en todos los casos sí que lo eran. Se procedió entonces a la observación

mediante microscopía electrónica de todos ellos, preparando muestras a partir de crecimientos en medio líquido (las cepas salvajes muestran flagelación polar) y en placas de agar de movilidad (las cepas salvajes muestran flagelación polar y lateral) paralelamente, incubados a 30°C durante 12 horas. En ningún caso aparecía flagelo polar, además de que los flagelos laterales tampoco se encontraban anclados a las células sino que estaban en el medio (Figura 3.A.13)

En los geles preparados para la observación del LPS de las cepas AH-1726, AH-1881, AH-1882, AH-1883 y AH-1884, no se observaron diferencias frente a la cepa salvaje correspondiente a cada uno de los mutantes.

Realizando los respectivos ensayos de adhesión a células HEp-2 en los cinco mutantes y haciendo uso de las cepas salvajes correspondientes a cada uno de los mutantes como control positivo, se pudo observar una acusada reducción de la adhesión en todos ellos. Los ensayos se realizaron también centrifugando las bacterias sobre la monocapa de células HEp-2 previamente a la infección (ver Tabla 3.A.7)

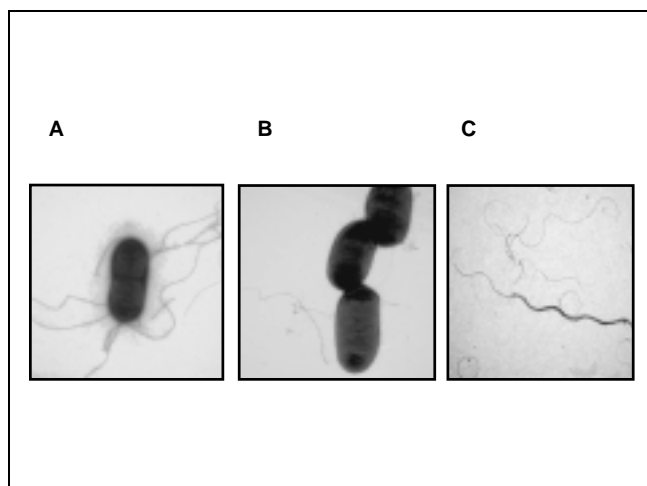


Figura 3.A.13 Microscopía electrónica de la cepa salvaje de *A. hydrophila* AH-3 (A), mutante no móvil AH-1726 derivado de AH-3 (B), flagelos dispersos por el medio encontrados frecuentemente en las preparaciones del mutante AH-1726 (C) Barra: 0'5 μm .

3.A.1.7.4 Obtención del clon pLA-Flm de AH-3

Haciendo uso de la librería genómica de AH-3 construida en $\lambda\text{pLA2917}$ y mantenida en *E. coli* DH5 α obtenida tal y como se describe en Material y Métodos, se complementó el mutante AH-1726 mediante conjugación triparental, transfiriendo de 10 en 10 los clones de dicha genoteca y sembrando en placas de TSA suplementadas con rifampicina, kanamicina y tetraciclina. Se sembraron en placas de agar semisólido todos ellos y tras incubarlos a 30°C durante 24 horas se seleccionaron aquellos clones que

habían recuperado la movilidad. De este modo obtuvimos el cósmido pLA-Flm que complementaba la mutación en *A. hydrophila* AH-3.

3.A.1.7.5 Secuenciación del clon pLA-Flm de AH-3

El clon pLA-Flm fue secuenciado usando de punto de partida los oligonucleótidos cebadores complementarios a la secuencia propia obtenida del plásmido pGEMTeasy-FlmB. De los tramos de secuencia obtenidos sobre una de las cadenas, se diseñaron nuevos cebadores, para llevar a cabo una secuenciación progresiva y en ambas direcciones. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se pueden encontrar en Material y Métodos.

Una vez obtenida la secuencia, se procedió al análisis preliminar de la misma. Se detectaron las posibles ORFs y se descartaron inicialmente todas las pautas de lectura de menos de 100 pb. Se consideraron de este modo 4 ORFs potencialmente significativas (las ORF1 y ORF4 incompletas) y sus productos de traducción fueron sometidos a una comparación frente a diferentes bases de datos de secuencias de ADN o proteínas para localizar aquellas que mostraran similitud con genes previamente descritos. También se buscaron putativos promotores delante de cada una de las ORFs, encontrando uno delante del ORF2 (la traducción de la cual muestra que es el homólogo de FlmA), que formaría un operón junto a la ORF3 (homóloga de FlmB) ya que ORF4 se transcribe en dirección opuesta, siendo su secuencia de aminoácidos similar a una putativa nucleotidil transferasa de azúcares (snt) de *Campylobacter jejuni*. Así mismo, la traducción en aminoácidos de la ORF1 muestra su mayor homología con una hipotética proteína de *Vibrio cholerae* (VC2381).

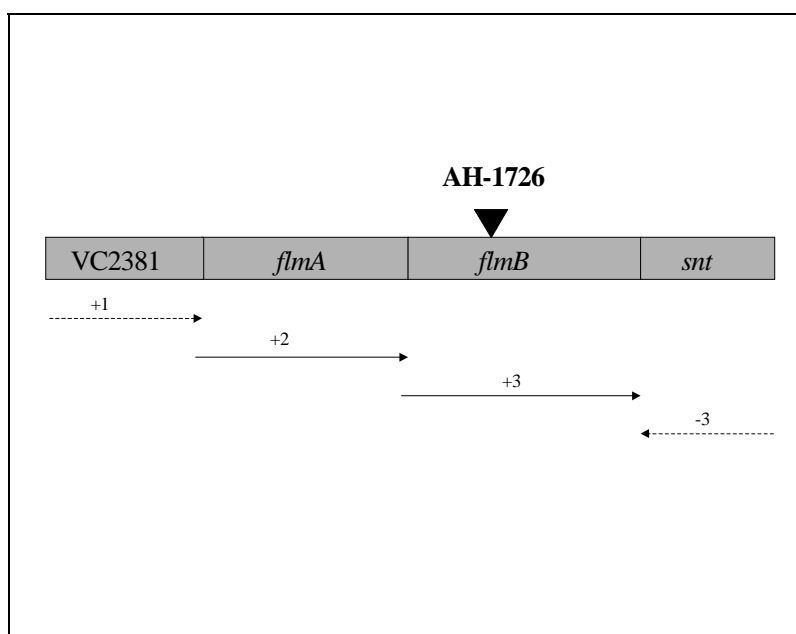


Figura 3.A.14 Organización genética del locus *flm* clonado de *A. hydrophila* AH-3. Las potenciales ORFs fueron llamadas como a sus homólogos en otras especies bacterianas. El triángulo indica el lugar de inserción en el genoma del mutante AH-1726. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+1, +2, +3, -3), de forma discontinua si la secuencia del gen está incompleta.

3.A.1.7.6 Secuencia nucleotídica completa y análisis de la misma

```

1   CCCAGCCCTT ACTGAACACA GTGTGGCGGC ATAGTTGGTG CTCTTTTAT
51  TAGCCGATCA CACTCTTGC ATAAAATGCT GGTACTTTAT TTGCTAGCAT
101 ATGATTCATC TACTGTTTTC ATAACGAGAT GTTCGCAATG TTCAATGATA
151 AAACGTTACT CATCACTGGC GGCACCTGGCT CGTTTGGCAA GATGCTGGTC
201 AAGACAGTGC TGGAACGCTA CAAGCCGAAA CGGCTCATCA TCTACTCCCG
251 CGATGAACTC AAACAGTTCG AGATGCAGCA GGTGTTCAAC GAACCCTGCA
301 TGCCTTATTT CATCGGGGAT GTGCGGGATG CCAACCGGCT GAACATGGCG
351 ATGCGTGGCG TTGATTACGT CGACGAGCAT GCAGCCGCTC TCAAGCAGGA
401 CCTGCCGCCG AGTACAAACC CCATGGAGTG CATCAAGACC AACATCCATG
451 GGGCGGAGAA CGTCATCCAG GCCGCCCTGC TCAATCAGGT CAAGAAGGTG
501 ATCGCTCTCT CCACCGACAA GGCCGCCAAC CCCATCAACC TGTATGGCGC
551 CACCAAAGTG GCTTCCGACA AGCTGTTTGT GGCGGCCAAC AATATTGCAG
601 GTCAGGATCC AACACGCTTC GCGGTCGTGC GCTACGGCAA TGTGGTGGGT
651 TCACGTGGAT CAGTCGTTCC CTTCTTCCAG AAACGGATCG ACCAGGGCGC
701 CGGCACGCTT CCCATCACCC ATGCCGAGAT GACCCGCTTC TGGATCACCC
751 TGCAGCAGGG GGTGGATTTT GTGATGAACA ACTTCCCGCG CATGAAAGGG
801 GGCGAGATCT TCGTGCCCAA GCTGCCTTCG GTACGGATCA CCGACCTGGC
851 TACCGCCATG GCGCCCCAGC TGGCACAGGA AATTATCGGT ATTGCCCCG
901 GTGAGAAGTT GCATGAAGTG ATGTGCCCTT CCGACGACTC CTATCACACC
951 TTCGAGTTCG ACGACTTCTT TGTCATCGGC CCAACCATCA ATTTCAATAA
1001 TCGCAACAAT GACTTCTCAG TCACAGCTGT GGGCGAAAAA GGTCTCATGG
1051 TCGAACAGGG TTTCGAATAT AACTCCCGCA ACAACAGCGA CTTCTGACG
1101 GTAGCCCAGC TAAAAGAGTT GAATGACAAG GTGGTAATGG AATGATCCCG
1151 TACGGCAGAC AATCGATCAG CGAGGCGGAT ATCGAAGCCG TAGTCGAGGT
1201 GCTTAGGTCC GATTTTCTGA CTCAGGGCCC GGTCGTCCCC CGCTTCGAGC

```

```

1251  AAGCAGTAGC CGATTACTGT GGCGCATGCT TTGGCGTCGC AGTGAACTCG
1301  GGTACGGCCG CTCTGCACAT CGCTTGTCTG GCTCTTGGTG TCGGCCCAGG
1351  GGACTGGGTC TGGACCTCCC CCATTAGCTT CGTCGCTTCG GCCAATTGTG
1401  CACTCTATTG CGGTGCTCAG GTCGACTTCG TCGACATAGA ACCGGATACC
1451  GGCAACATGT GCGCACTGGA GCTGGAGCGC AAACTGACTG TCGCCAAGGC
1501  GCAAGGACGC CTGCCCCAAGG TGGTCATTCC GGTACACTTC GCAGGCTTGC
1551  CCTGCGATAT GAAAGAGATC CACCGTCTGG GCCAGGAGTA CGGTTTTTCG
1601  ATCATAGAAG ATGCCTGCCA CGCCCTCGGC GCCCGCTATC ACGGCGAACC
1651  GACCGGCAAT GGCCGCTACA GCAACATCAC AGTCTTCAGC TTCCATCCGG
1701  TGAAAATCAT CACCACCGGC GAAGGCGGCA TGGCCATGAC CAATGATCCC
1751  GCGCTAGCCA AAACCATGCG CATGCTGCGC AGCCATGGCA TCACCCGTGA
1801  ACCGGAAGAC TTCATCAACG AACCGGACGG TCCTTGGTAC TACGAGCAAC
1851  AAATGTTAGG TTTCAACTAC CGCATGACAG ATATCCAGGC AGCATTGGGG
1901  TTGAGCCAAA TGTCTCGGTT AGAGGAGTTC TTGGCTAAAC GAAGGGAGAT
1951  TGCCGCACGT TATCATACTG AATTACCACG TCTTGACTTG GAAGTCCTAT
2001  CAGACCGCAA TAACCGACTC TCAGCTTGGC ACCTGTTTGT TATCAAAGTT
2051  CCAGCTAAAT ATCGTAAAAC GCAGTTTCGAA CAGCTCAGAG CACAGGACAT
2101  AGGCGTAAAT GTGCACTATA TCCCCATAGG GAGTCATCCT TATCACACAG
2151  GTAATTGTAG GAAAGCGGTA TACTTTTACG AGCAACTGAT TACTTTACCA
2201  CTGTACCCTA CCTTATTGGA ACAAGAAGGA GCATTAATGG AGGTTATCCA
2251  TCAGACACAA TATCTCTTGAT AATCATGAGT TACCTGCTGG TAACTCATGA
2301  TTATTCGTAA CAAGCTAGAT CTTCTGGTGA ATCAATTTC CCCCACTGTC

```

Figura 3.A.15 Secuencia nucleotídica contenida en el cósmido pLA-Flm. Los codones de inicio así como los codones de parada de las cuatro pautas de lectura abierta establecidas se han marcado subrayando y en negrita respectivamente. El putativo promotor también está subrayado delante de *flmA*. El inicio de transcripción sería el nucleótido marcado con la letra más grande.

Tanto la ORF2 como la ORF3, ambas pertenecientes al locus *flm* de AH-3 se transcriben en la misma dirección y no existe separación entre ambas, ya que el codón de parada de la ORF2 está solapado con el codón de inicio de la ORF3. Además, se pueden localizar posibles secuencias de unión a ribosomas a la distancia apropiada de los codones de inicio de cada ORF.

Las principales características de cada una de las ORF se pueden resumir en la tabla 3.A.6, así como su localización en la secuencia nucleotídica de la figura 3.A.15.

| ORF | Posición | %G+C | Proteína codificada | | pI ^a | GRAVY ^b |
|-------|-----------|------|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | aa | KDa ^a | | |
| ORF-2 | 138-1145 | 73,5 | 335 | 37,501 | 6,55 | -0,207 |
| ORF-3 | 1142-2269 | 60,1 | 375 | 42,012 | 5,91 | -0,118 |

Tabla 3.A.6 Principales características de las 2 ORFs localizadas en la secuencia nucleotídica y su ubicación en la misma.

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de ExPASy.

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle, (1982).

3.A.1.7.7 Análisis de las diferentes ORFs

ORF2

La ORF2 codifica para una proteína de 335 aminoácidos, localizada a la cabeza del putativo operón *flm* de *A. hydrophila* AH-3, y por homología se correspondería con la proteína FlmA secuenciada anteriormente en *A. caviae* Sch3N, con la que presenta un 68% de similaridad y un 53% de identidad, a pesar de estar incompleta la secuencia en *A. caviae*. Detallamos a continuación las proteínas que concretamente mostraron mayor homología con el producto de traducción de la ORF2, que fueron una posible epimerasa/dehidratasa de azúcares de *Campylobacter jejuni* (Parkhill y col., 2000), con un porcentaje de similaridad del 78% y de identidad del 66%; FlaA1 de *Helicobacter pylori* (Tomb y col., 1997), con un 73% de similaridad y un 60% de identidad y la proteína de modificación flagelar FlaA1 o FlmA de *Caulobacter crescentus* (Leclerc y col., 1998) con un porcentaje de similaridad del 72% y de identidad del 57%.

Nos encontramos como en el caso de FlmA de *A. caviae* Sch3N con diversas proteínas implicadas en la modificación de azúcares, que podrían afectar directamente en la formación del flagelo.

Tal como indicamos previamente, se denominó FlmA a la ORF2.

```
MFNDKTLITGGTGSFGKMLVKTVLERYPKRLIIYSRDELKQFEMQQVFNEPCMRYFIG
DVRDANRLNMAMRGVDYVDEHAAALKQDLPPSTNPMECIKTNIHGAENVIQAALLNQVKK
VIALSTDKAANPINLYGATKLASDKLFVAANNIAGQDPTRFAVVRYGNVVGSRGSVPPFF
QKRIDQGAGTLPITHAEMTRFWITLQQGVDFVMNNFPRMKGGEIFVPKLPISVRITDLATA
MAPQLAQEIIGIRPGEKLHEVMCPSSDYSYHTFEFDDFFVIGPTINFNNRNNDFSVTAVGE
KGLMVEQGFYNSRNNSDFLTVAQLKELNDKVVME
```

Figura 3.A.16 Secuencia traducida en aminoácidos de FlmA de *A. hydrophila*

ORF3

De manera solapada al codón de parada de FlmA, encontramos la ORF3, codificando un producto de 375 aminoácidos, el cual muestra homología principalmente con la proteína de modificación de la flagelina FlmB de *C. crescentus* (Lecrerc y col., 1998) con un porcentaje de similaridad del 58% y de identidad del 43%; de nuevo como en el caso de FlmB en *A. caviae* Sch3N, con las proteínas Spsc de *Metanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996), con un 58% de similaridad y un 37% de identidad y de *Bacillus subtilis* (Kunst y col., 1997) respectivamente, con un 56% de similaridad y un 37% de identidad. Con la propia FlmB de *A. caviae* Sch3N presenta un porcentaje de similaridad del 70% y de identidad del 54%.

La mutación de AH-1726 se localiza en esta ORF.

Tal como indicamos previamente, se denominó FlmB a la ORF3.

```
MIPYGRQSISEADIEAVVEVLRSDFLTQGPVVPFRFEQAVADYCGACFGVAVNSGTAALHI
ACLALGVGPGDWVWTSPISFVASANCALYCGAQVDFVDIEPDTGNMCALELERKLTVAKA
QGRLPKVVIPVHFAGLPCDMKEIHRLGQEYGFRIIEDACHALGARYHGEPTGNGRYSNIT
VFSFHPVKIITTGEGGMAMTNDPALAKTMRMLRSHGITREPEDFINEPDGPWYYEQQMLG
FNRYRMTDIQAALGLSQMSRLEEFLLAKRREIAARYHTELPRLDLEVLSDRNNRLSAWHLFV
IKVPAKYRKTQFEQLRAQDIGVNVHYIPIGSHPHYHTGNCRKAVYFYEQQLITLPLYPTLLE
QEGALMEVIHQTYL
```

Figura 3.A.17 Secuencia traducida en aminoácidos de FlmB de *A. hydrophila*.

3.A.1.7.8 Distribución del locus *flm* en *Aeromonas* mesófilas mediante PCR

Se diseñaron las parejas de cebadores FLMC-FLMB5 y FLMB3-FLMB7 en la secuencia nucleotídica de *A. hydrophila* AH-3 para realizar las correspondientes PCRs en diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas, utilizando la propia AH-3 como control positivo, en la cual la primera PCR amplificaba una banda sencilla de 976 pb por la hibridación de cada uno de los cebadores a ambos extremos terminales de los genes *flmA* y *flmB*, y la segunda PCR generaba una banda también sencilla de 1136 pb por la hibridación del primer cebador en el inicio de *flmB* y del segundo en el extremo terminal del *snt*.

Las cepas estudiadas fueron: *A. caviae* Sch3N, *A. hydrophila* serogrupo O:3 y O:25, *A. veronii* bv. *sobria* AH-1 (serogrupo O:11) y *A. veronii* bv. *veronii* AS-28 (serogrupo O:11); y las condiciones de cada una de las PCRs fueron, una Tª de

hibridación ADN/cebador de 60°C y un tiempo de extensión de 45 segundos y 1 minuto 15 segundos respectivamente.

Para la pareja de cebadores FLMC-FLMB5 se obtenía la misma banda amplificada en todos los casos, sugiriendo que en la mayoría de *Aeromonas* mesófilas los genes *flmA* y *flmB* se encuentran adyacentes. En el caso de la pareja de cebadores FLMB3-FLMB5, la única cepa que no mostró la misma banda amplificada fue *A. caviae* Sch3N, lo que junto a los resultados obtenidos de los Southern blot (ver 3.A.1.7.1) sugiere que además de encontrarse adyacentes los genes *flmA* y *flmB* en la mayoría de *Aeromonas* mesófilas, esta pareja de genes suele estar situada de forma anterior a una *snt* y no formando un operón con *neuA-flmD-neuB* como es el caso de *A. caviae* Sch3N.

3.A.1.7.9 Complementación de los mutantes AH-1726, AH-1881, AH-1882, AH-1883 y AH-1884 con el clon pLA-Flm

Tras complementar cada uno de los mutantes AH-1726, AH-1881, AH-1882, AH-1883 y AH-1884 mediante conjugación triparental con la cepa portadora del clon pLA-Flm, se seleccionaron las colonias con resistencia a los antibióticos rifampicina, kanamicina y tetraciclina, y se sometieron a examen tanto para el estudio de la movilidad, como para la expresión de flagelo y para la adhesión a células HEp-2.

Todos ellos resultaron móviles y expresaban flagelación polar o lateral según la fluidez del medio de cultivo. Así mismo recuperaban la adhesión que presentaban las cepas salvajes de las cuales procedían cada uno de los mutantes.

| Cepa o plásmido y mutante | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 ± SD | |
|--|-------------------------------------|-----------------|
| | Normal | Centrifugada |
| <i>A. hydrophila</i> AH-3 (salvaje) | 18,3 ± 2,2 | 31,6 ± 3,0 |
| Mutante en FlmB de AH-3, AH-1726 | 9,4 ± 1,2 (51) | 29,6 ± 3,2 (93) |
| AH-1726 complementado con pLA-Flm | 18,0 ± 2,5 | 32,5 ± 2,3 |
| <i>A. hydrophila</i> O:3 (salvaje) | 21,6 ± 2,4 | 42,7 ± 4,3 |
| Mutante en FlmB de O:3, AH-1881 | 10,1 ± 1,9 (46) | 40,8 ± 5,1 (95) |
| AH-1881 complementado con pLA-Flm | 21,9 ± 3,2 | 42,1 ± 5,2 |
| <i>A. hydrophila</i> O:25 (salvaje) | 16,0 ± 2,4 | 29,3 ± 2,8 |
| Mutante en FlmB de O:25, AH-1882 | 7,7 ± 1,3 (48) | 28,6 ± 2,9 (96) |
| AH-1882 complementado con pLA-Flm | 15,7 ± 2,6 | 29,9 ± 3,1 |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> AH-1 (salvaje) | 32,3 ± 3,9 | 71,4 ± 10,7 |
| Mutante en FlmB de AH-1, AH-1883 | 18,1 ± 2,2 (56) | 67,3 ± 9,9 (94) |
| AH-1883 complementado con pLA-Flm | 31,6 ± 4,4 | 70,3 ± 9,2 |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> AS-28 (salvaje) | 31,7 ± 4,6 | 66,8 ± 10,2 |
| Mutante en FlmB de AS-28, AH-1884 | 15,5 ± 3,4 (48) | 63,3 ± 9,1 (94) |
| AH-1884 complementado con pLA-Flm | 32,4 ± 3,8 | 65,9 ± 10,0 |

Tabla 3.A.7 Adhesión de diferentes cepas de *Aeromonas* mesófilas con o sin el efecto de centrifugar las mismas sobre las células HEp-2 previamente a la infección. Los valores en paréntesis son los porcentajes respecto al control.

3.A.2 Discusión

Se utilizó para iniciar este estudio el modelo celular HEp-2 con el objetivo de identificar los genes envueltos en el mecanismo de adhesión de *A. caviae* Sch3N, cepa de la cual estudios preliminares mostraban sus patrones de adhesión a las líneas de células epiteliales humanas HEp-2 y Caco-2 (Thornley y col., 1996). Dichos estudios muestran así mismo la implicación del flagelo polar en el proceso de adhesión de la cepa, del mismo modo que la caracterización fenotípica de los cuatro mutantes generados por transposición del mini-Tn5-Cm de *A. caviae* Sch3N; IAG75, IAG570, IAG1419 e IAG1639, que además de mostrarse no adherentes, carecen de flagelo. Las copias salvajes de los genes mutados se clonaron y secuenciaron para ser ubicados en un putativo operón

envuelto en el ensamblaje del flagelo así como en la biosíntesis del antígeno O del LPS. Dicho operón está formado por cinco putativos genes (de ORF1 a ORF5), el producto de los cuales es similar a una serie de proteínas bacterianas para la biosíntesis de polisacárido, aunque concretamente las ORF1, ORF2 y ORF4 son más similares a las proteínas flagelares FlmA, FlmB y FlmD de *C. crescentus* respectivamente. Las citadas proteínas Flm están envueltas en el ensamblaje del flagelo de *Caulobacter*, posiblemente a través de la glicosilación, como modificación postraduccional, de la flagelina u otras proteínas flagelares (Lecrerc y col., 1998). Sin embargo, los mutantes *flm* de *Caulobacter*, no muestran defectos en el perfil del LPS (Lecrerc y col., 1998), a diferencia de los mismos en *A. caviae* Sch3N. Por lo tanto, una explicación alternativa para justificar la pérdida del flagelo en los mutantes por inserción de transposón de *A. caviae* Sch3N que afectan al Ag-O del LPS, sería el fenotipo “rough” que muestran los mutantes de núcleo del LPS (*rfa*) de *E. coli* (Parker y col., 1992). Tales mutaciones afectarían la correcta inserción de proteínas de membrana externa así como la unión del Ag-O a la estructura del LPS mediante la desestabilización de dicha membrana externa. De este modo, las mutaciones en el locus *flm* de *A. caviae* también afectarían la inserción de otras adhesinas en la mencionada membrana. Sin embargo, esta putativa adhesina no parece ser una proteína de membrana externa, dado que no aparece diferencia alguna en el perfil de proteínas de membrana externa de los cuatro mutantes respecto de la cepa salvaje cuando dicho perfil se analiza en geles de poliacrilamida. (No se muestran los datos).

Con el objetivo de explicar este fenómeno, se investigó la presencia de los genes a estudio (*flmA*, *flmB*, *neuA*, *flmD* y *neuD*) en diferentes *Aeromonas* spp. mesófilas, entre las que se incluye *A. hydrophila* AH-3 (serogrupo O:34). Esta última cepa en particular se eligió debido a que se tienen clonados y secuenciados los genes responsables de la biosíntesis del antígeno O:34 del LPS de la misma, además de conocerse la composición de su LPS (resultados no publicados). Los homólogos a los genes *flmA* y *flmB* se encontraron en todas las cepas estudiadas (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *veronii* y *A. veronii* bv. *sobria*) mediante hibridación dot blot, sin embargo los otros tres genes, *neuA*, *flmD* y *neuB*, únicamente se encontraron en *A. caviae* Sch3N. Esto sugiere que *A. caviae* Sch3N es diferente a muchas otras *Aeromonas* mesófilas, incluyendo a su propia especie, y que posiblemente la cepa ha sufrido una reorganización genética para incluir los genes *flmA* y *flmB* en un putativo operón junto con *neuA*, *flmD* y *neuB*.

Mediante PCR se amplificó un fragmento interno del gen homólogo a *flmB* en *A. hydrophila* AH-3, con el cual se generó un mutante por inserción definida en dicho gen. El mutante *flmB* de AH-3 carecía de flagelo (tanto polar como lateral) además de no ser

móvil, y tal como muestra la microscopía electrónica, dicho mutante era capaz de sintetizar ambos flagelos pero no de anclarlos a la célula. En cuanto al LPS, sin embargo, el mutante no mostraba diferencias respecto a la cepa salvaje, algo parecido a lo que ocurre con los mutantes *flm* de *Caulobacter* y de otras cepas de *Aeromonas* mesófilas de las cuales también se obtuvo el correspondiente mutante en *flm*.

Tras secuenciar el plásmido que complementaba la mutación en *flmB* de la cepa AH-3, quedó claro que los genes *flmA* y *flmB* estaban situados de manera adyacente además de transcribirse en la misma dirección pero no se encontraba a continuación el gen *neuA* como en *A. caviae* Sch3N, sino que había un gen similar a una putativa nucleotidil transferasa de azúcares de *C. jejuni*, transcrita en dirección contraria a los genes *flm*. Ésta podría ser una explicación razonable de que no se encontrasen cambios en el perfil del LPS del mutante *flmB* en AH-3. En las otras cuatro cepas estudiadas de *Aeromonas* mesófilas podríamos encontrar una situación similar. Así mismo en la secuencia anterior a *flmA* de AH-3 se encuentra homología con una hipotética proteína de *Vibrio cholerae* (VC2381), transcrita en la misma dirección que los dos genes *flm*, aunque un putativo promotor delante de *flmA* indicaría que dicha proteína no forma parte del mismo operón.

En el caso de *A. caviae* Sch3N, el fenotipo de la cepa salvaje y de los mutantes complementados no nos permite valorar el papel del flagelo o del Ag-O del LPS respecto a la adhesión separadamente. Cualquiera de las dos estructuras superficiales o ambas a la vez podrían ser responsables de la adhesión de la cepa *in vitro*. La habilidad de los mutantes complementados, y por lo tanto móviles, de adherirse a las células HEp-2, y el incremento de dicha adhesión al centrifugar las bacterias sobre la monocapa, sugieren que tanto el flagelo como la movilidad están implicados en la adhesión. Además de que la inhibición de aproximadamente un 50% de la adhesión debida a anticuerpos anti-flagelina polar (no se muestran los datos) refuerza la idea de la importancia de la movilidad y el flagelo en el proceso. Estudios preliminares muestran que el flagelo polar y la movilidad de *A. hydrophila* serogrupo O:34 se necesitan para la adhesión e invasión de líneas celulares de peces, dado que mutantes no flagelados por inserción de Tn5 carecen de la facultad de adhesión e invasión; sin embargo los genes mutados no se han identificado (Merino y col., 1997c). El Ag-O del LPS también se ha descrito como adhesina para *Aeromonas*. Concretamente, algunos trabajos han asociado la expresión del Ag-O del LPS con la adhesión a células HEp-2 de aislados clínicos de *A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *sobria* (Aguilar y col., 1997; Francki y Chang, 1994; Merino y col., 1996a). Además, mutantes del Ag-O del LPS por la inserción de transposón en *A. hydrophila* O:34 se

muestran incapaces de colonizar el modelo de intestino de pollos axénicos (Merino y col., 1996b).

Los mutantes *flmB* de *A. hydrophila* y las otras cepas de *Aeromonas* mesófilas, excluyendo a *A. caviae* Sch3N, nos permiten concluir que el flagelo es esencial para la colonización de células HEP-2, porque estas cepas, aun siendo no adherentes, no móviles y carentes de flagelo, mantienen su LPS completo. Sin embargo, sólo se da una pérdida del 60% de la adhesión en el mutante *flmB* de AH-3, frente al 80-90% de pérdida en el respectivo mutante de la cepa Sch3N de *A. caviae*. Adicionalmente, la mutación en *flmB* de AH-3 puede ser parcialmente recuperada y los niveles de adhesión llegar a los mismos que en la cepa salvaje, si se centrifugan las bacterias sobre la monocapa. Esto no ocurre en Sch3N donde los niveles tras la centrifugación sólo se recuperan en el orden del 12-50% respecto a la cepa salvaje, probablemente debido a que los mutantes *flm* de *A. caviae* Sch3N carecen de dos adhesinas: el flagelo y el Ag-O del LPS. Tras la centrifugación, los mutantes IAG570 e IAG1639, ambos en *flmB*, causan la mayor pérdida de la colonización de células HEP-2. Esto posiblemente se debe a que la proteína FlmB se necesite para la expresión de otras adhesinas o bien actúe ella misma como tal, aunque los perfiles de proteínas membrana externa de los mutantes *flmB* no difieran de los de los otros mutantes o de la cepa salvaje (no se muestran los datos).

3.B.1 Resultados

La existencia de dos sistemas de flagelación en *Aeromonas* spp. mesófilas, polar y lateral respectivamente, así como la posible vinculación del sistema de flagelación peritrica inducida con la colonización de superficies sólidas, nos llevó a estudiar en profundidad dicha flagelación lateral mediante su caracterización genética y fenotípica.

3.B.1.1 Caracterización de la flagelina lateral de *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N

3.B.1.1.1 Observación mediante microscopía electrónica

Se procedió a la observación de las cepas *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N mediante microscopía electrónica, preparando muestras a partir de crecimientos en líquido (BHIB), en las que ambas muestran la posesión de un único flagelo polar sin vaina, y a partir de placas de TSA donde pueden observarse múltiples flagelos laterales además del polar en las dos cepas. Los crecimientos, ya sea en medio líquido o bien sobre placa se habían incubado a 30°C para AH-3 y 37°C en el caso de Sch3N durante 16 horas previamente a la preparación de las muestras para la microscopía, que se realizó tal y como se describe en Material y Métodos (Figura 3.B.1)

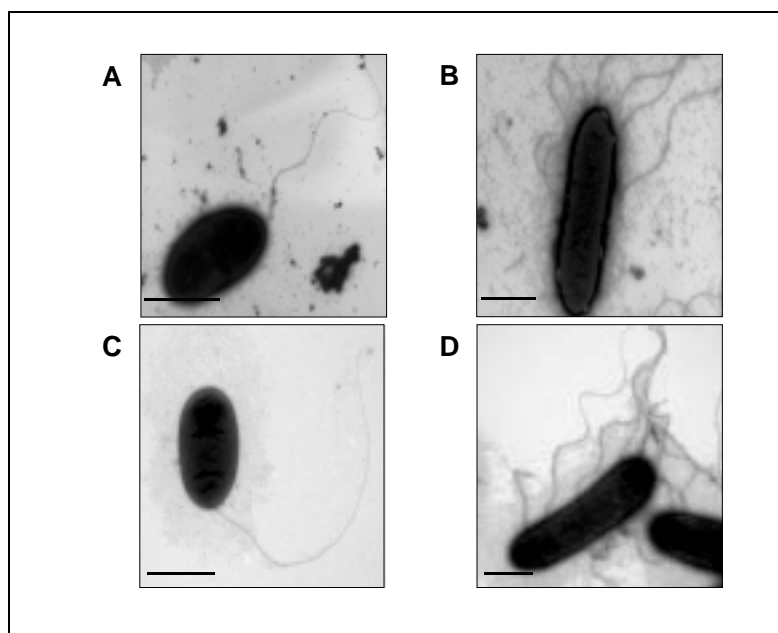


Figura 3.B.1 Microscopía electrónica de transmisión de las cepas salvajes *A. caviae* Sch3N y *A. hydrophila* AH-3 respectivamente, crecidas en BHIB (Fotos A y C) o sobre TSA (fotos B y D). Barra = 0,6μm

3.B.1.1.2 Purificación de las flagelinas y observación en SDS-PAGE

Tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, se hicieron extracciones de flagelo, tanto polar (a partir de crecimiento líquido en BHIB) como lateral (cuando la extracción se realizaba recogiendo crecimientos desde placas de TSA), partiendo de las cepas salvajes *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N. Así mismo se observó el producto purificado mediante análisis de SDS-PAGE, en geles de poliacrilamida al 12% y realizando la tinción con azul de Coomassie.

Los resultados mostraron una proteína de 35,5 kDa en ambas extracciones a partir de crecimiento en líquido, tamaño que se corresponde con la flagelina polar de *A. caviae*, recientemente caracterizada por Rabaan y col., (2001). A partir de los crecimientos en medio sólido, las dos cepas presentan una proteína complementaria de menor tamaño, concretamente 31,5 kDa. Ambas bandas se recortaron y purificaron para observar de nuevo separadamente (Figura 3.B.2).

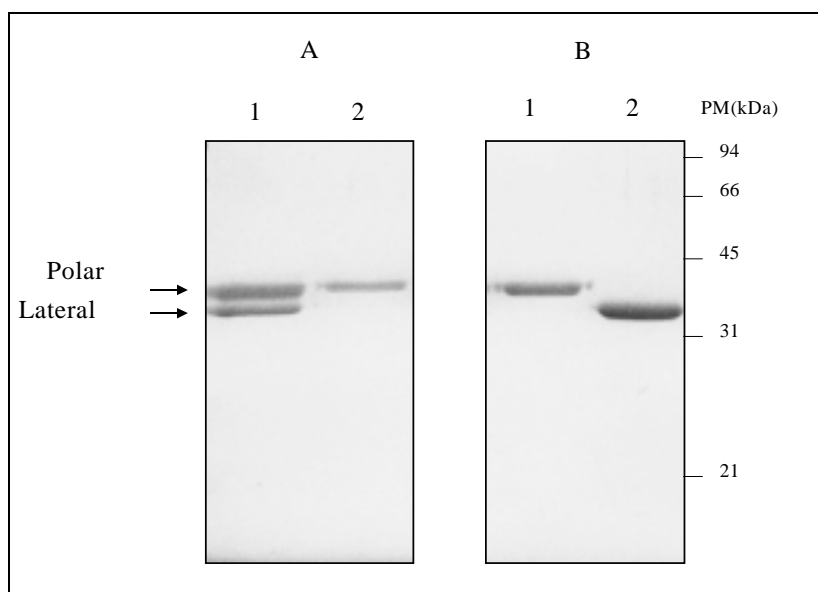


Figura 3.B.2 Observación mediante SDS-PAGE de flagelos purificados de la cepa *A. caviae* Sch3N. A. Línea 1: A partir de placa. Línea 2: A partir de medio líquido. B. Línea 1: Proteína de 35,5 kDa purificada. Línea 2: Proteína de 31,5 kDa purificada. No se muestran los resultados de *A. hydrophila* AH-3.

3.B.1.1.3 Obtención de la secuencia N-terminal de las proteínas de 35,5 y 31,5 kDa respectivamente

Se transfirieron las dos proteínas, de 35,5 y 31,5 kDa respectivamente, de las cepas *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N desde geles de poliacrilamida al 12% a

membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham) y siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos se obtuvo la secuencia amino terminal de todas ellas.

La secuencia amino terminal de las proteínas de 35,5 kDa nos permitió confirmar que se trataba de la flagelina polar tanto en AH-3 como en Sch3N, mientras que las secuencias de ambas proteínas de 31,5 kDa tuvieron que someterse a contraste con los bancos de datos para asociar por la alta homología presentada con la flagelina lateral de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter y Wright, 1993). Así mismo, las secuencias obtenidas de las flagelinas laterales de cada una de las dos cepas mostraban una identidad entre sí de 17/19 aminoácidos.

1 **-GLSIHTNFASNTTQNQLNS**

2 **-GLSIHTNFASLTTQNQLNN**

Figura 3.B.3. Secuencia N-terminal de las cepas *A. hydrophila* AH-3 (1) y *A. caviae* Sch3N (2). En rojo están marcados los dos únicos aminoácidos que difieren entre ambas secuencias.

3.B.1.1.4 Análisis de glicosilación de las flagelinas laterales

Dado que estudios previos muestran la glicosilación de la flagelina polar de *A. caviae*, se realizó en las flagelinas laterales tanto de *A. hydrophila* AH-3 como de *A. caviae* Sch3N la detección de grupos glicosil mediante los métodos descritos por Doig y col., (1996) y Gerard, (1990) respectivamente. La Figura 3.B.4 indica que la flagelina lateral de *A. caviae* Sch3N está glicosilada, así como la de *A. hydrophila* AH-3 (no se muestran los resultados).

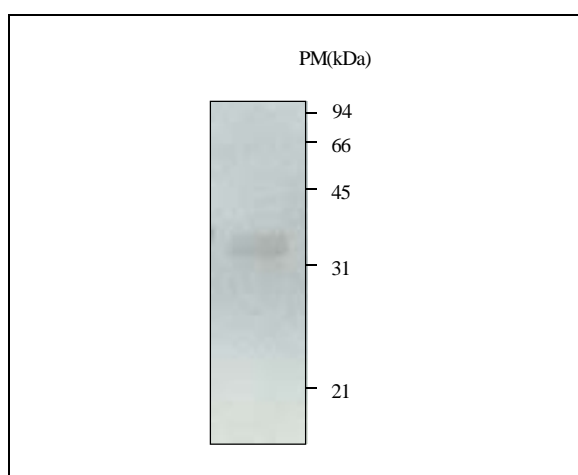


Figura 3.B.4 Detección de grupos glicosil sobre la flagelina lateral de *A. caviae* Sch3N según el método de Doig y col., (1996).

3.B.1.2 Caracterización del locus del flagelo lateral de

***A. hydrophila* AH-3**

3.B.1.2.1 Obtención de mutantes por transposición de mini-Tn5 Km con “swarming” reducido

Con el objetivo de comenzar el estudio genético del flagelo lateral, se generaron mutantes de AH-3 con “swarming” reducido. La mutagénesis se llevó a cabo por inserción genómica del elemento de transposición mini-Tn5::Km1, el cual se transfirió mediante conjugación entre la cepa portadora de dicho transposón, *E. coli* S₁₇₋₁λ*pyr* (pUTmini-Tn5::Km1) y la cepa receptora, AH-3R (mutante espontáneo de AH-3 resistente a rifampicina). La selección de los conjugantes se produjo a 30°C en placas de TSA con rifampicina y kanamicina. Se subcultivaron alrededor de 1000 mutantes generados, los cuales se estudiaron de forma cualitativa por reducción en la generación del “swarming” en placas de agar semisólido. Se seleccionaron y aislaron de este modo 3 de los mutantes a los que se les llamó AH-1982, AH-1983 y AH-1984 respectivamente.

3.B.1.2.2 Caracterización genética de los mutantes AH-1982, AH-1983 y AH-1984

De los 3 mutantes AH-1982, AH-1983 y AH-1984 de AH-3 por inserción de un mini-Tn5 en su genoma que mostraban una clara reducción del “swarming” en placas de movilidad, procedimos a localizar la secuencia genómica adyacente al transposón, mediante clonación del mismo.

3.B.1.2.2.1 Clonaje del mini-Tn5

Para conseguir el clonaje del mini-Tn5 de los diferentes mutantes se realizó una digestión total del material genómico con las enzimas de restricción *EcoRV*, *EcoRI* y *PstI*, dianas elegidas por no presentar lugar de restricción dentro del transposón (*EcoRV*) o bien por tener una única diana en uno de sus extremos, manteniendo entero el determinante de resistencia a la kanamicina (*EcoRI* y *PstI*). El ADN digerido de esta manera se hibridó con una sonda marcada con digoxigenina de la región correspondiente al determinante de resistencia a la kanamicina del mini-Tn5 con el fin de localizar el transposón y facilitar su clonaje. En todos los casos, el tamaño de las bandas que reaccionaron con la sonda en las digestiones *EcoRV* resultó ser demasiado grande para su clonaje por lo que se descartó, al igual que las bandas resultantes de la digestión *EcoRI* en los mutantes AH-1982 y AH-1983. De este modo también se confirmó que cada uno de los mutantes poseía una única copia del transposón.

Así pues, el producto de las digestiones del ADN genómico de todos los mutantes con *Pst*I y del mutante AH-1983 con *Eco*RI se ligó al vector pBCSK, cortado con cada una de las enzimas y defosforilado para evitar la formación de religados del vector, y se transfirió por transformación (mediante electroporación) a la cepa *E. coli* XL1-Blue. La selección de los clones que contenían el mini-Tn5 se realizó suplementando las placas de LB agar con cloranfenicol y kanamicina.

De este modo se consiguió clonar el mini-Tn5 de cada uno de los mutantes y, junto a él, las zonas adyacentes al lugar de inserción, hasta el primer sitio de restricción de las enzimas *Eco*RI y *Pst*I a cada uno de los lados del transposón.

3.B.1.2.2.2 Secuenciación de los fragmentos de ADN adyacentes al transposón

La secuenciación de cada uno de los fragmentos clonados se realizó utilizando los cebadores ISI e ISO, específicos para los extremos del mini-Tn5 así como M13 for y T3 para los extremos del vector. Las secuencias obtenidas se compararon con otras preexistentes en bases de datos de ADN y proteínas para comprobar si existía alguna similitud con genes previamente descritos, y de este modo determinar en qué gen se encontraba la mutación.

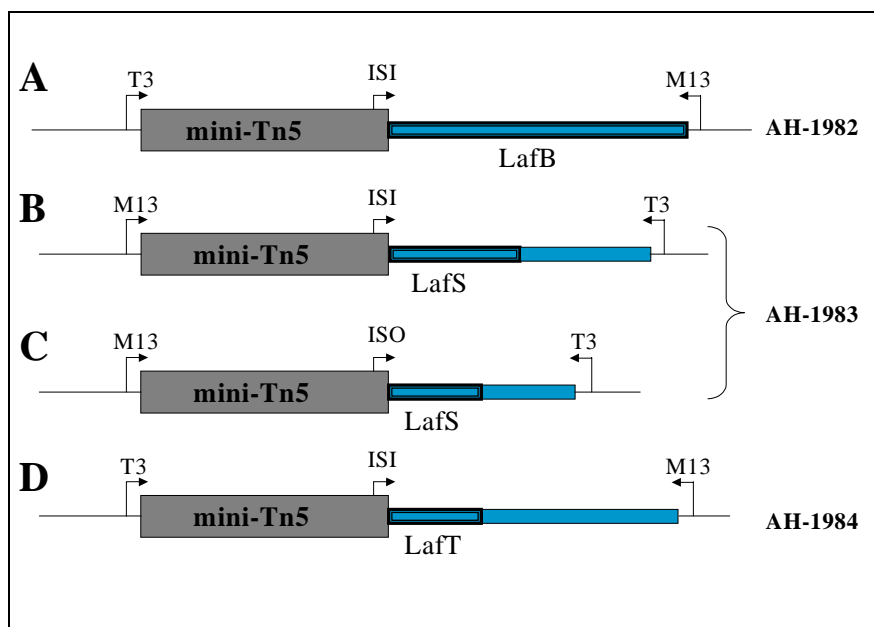


Figura 3.B.5 Esquema de los fragmentos de cada mutante clonados en pBCSK, con los cebadores utilizados para secuenciar y los genes que contienen la mutación, llamados como a sus homólogos en *V. parahaemolyticus*. Las medidas de cada fragmento, por aproximación en la observación en geles de agarosa, son 3,4 kb (AH-1982), 2,7 y 2 kb (AH-1983) y 2,6 kb (AH-1984).

Lugar de inserción en el mutante AH-1982

La secuencia nucleotídica obtenida desde los extremos del vector pBCSK así como con el cebador ISI del transposón y comparada con las bases de datos de ADN y proteínas mostró que la proteína codificada por el gen truncado mostraba similitud con proteínas responsables de constituir el “capuchón” del filamento flagelar, principalmente del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*. Dicha proteína recibió por homología el nombre de LafB.

Lugar de inserción en el mutante AH-1983

En el caso de la secuencia obtenida a partir del mutante AH-1983 con los mismos cebadores del vector y ambos ISI e ISO del transposón, la similitud en las bases de datos la relacionó con la proteína LafS de *V. parahaemolyticus*, factor σ^{28} para la síntesis del flagelo lateral del mismo. La proteína recibió por homología el nombre de LafS.

Lugar de inserción en el mutante AH-1984

Para el mutante AH-1984 se encontró mediante la secuenciación a partir de los cebadores T3, M13 for e ISI que la inserción del transposón se encontraba en LafT de *V. parahaemolyticus*, uno de los componentes del motor del flagelo lateral. La proteína recibió por homología el nombre de LafT.

3.B.1.2.3 Clonaje del locus afectado en los mutantes

3.B.1.2.3.1 Obtención de sondas específicas

A partir de la secuencia nucleotídica obtenida de los fragmentos adyacentes al lugar de inserción del mini-Tn5 de los mutantes, pudimos diseñar cebadores específicos para los genes mutados, concretamente se utilizaron las dos parejas de cebadores LAFBB-LAFBDI y LAFSF-LAFSR que se sometieron a sendas reacciones de PCR con 56°C y 54°C respectivamente de Tª de hibridación ADN/cebador y con un tiempo de extensión de 45 segundos en ambas. Los productos de amplificación obtenidos, de 619 pb para la primera pareja de cebadores y de 764 pb para la segunda, se marcaron con digoxigenina tal como se describe en Material y Métodos para usarlos como sonda.

3.B.1.2.3.2 Hibridación de la librería genómica

Con las dos sondas obtenidas, que contenían parte de los tres genes salvajes mutados por el transposón, se procedió al estudio de la librería genómica de AH-3 construida en λ pLA2917 y mantenida en *E. coli* DH5 α obtenida tal y como se describe en Material y Métodos. Dicho estudio se realizó mediante colony blot con las dos sondas en paralelo.

Como control positivo se utilizó la propia cepa sobre la cual se había construido la librería, AH-3, y como control negativo la cepa DH5 α de *E. coli* y tras el revelado de la hibridación se obtuvo un clon que reaccionaba de manera positiva con las dos sondas.

Para confirmar el resultado obtenido, se aisló el ADN plasmídico del clon y se comprobó mediante PCR (con los mismos cebadores empleados para la obtención de las sondas) que las bandas amplificadas correspondieran al tamaño esperado. También en la PCR se emplearon controles, el ADN genómico de AH-3 como control positivo y ADN plasmídico de pLA2917 como control negativo. De este modo obtuvimos el cósmido pCOS-LAF que contenía las copias salvajes de los tres genes mutados por mini-Tn5, *lafB*, *lafS* y *lafU*.

3.B.1.2.3.3 Secuenciación del clon

El cósmido pCOS-LAF fue secuenciado usando de punto de partida los oligonucleótidos cebadores complementarios a las secuencias ya obtenidas anteriormente de los fragmentos flanqueantes del mini-Tn5, así como los cebadores CSpLA y RpLA complementarios a las secuencias que flanquean la diana de restricción *Bgl*II en el cósmido pLA2917. De los tramos de secuencia obtenidos sobre una de las cadenas, se diseñaron nuevos cebadores, que nos permitiesen continuar con la secuenciación en ambas direcciones del inserto de pCOS-LAF. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se pueden encontrar en Material y Métodos.

Una vez obtenida la secuencia, se procedió al análisis preliminar de la misma. Se detectaron las posibles ORFs en función de la presencia de los codones de inicio y de terminación y se descartaron inicialmente todas las pautas de menos de 100 pb. Se consideraron de este modo 9 ORFs potencialmente significativas y sus secuencias nucleotídicas fueron sometidas a diferentes bases de datos de ADN o proteínas con tal de compararlas y detectar aquellas que mostraran similitud con genes previamente descritos. Además se buscaron putativos promotores delante de cada una de las ORFs aunque sólo se encontró una putativa secuencia promotora delante de *lafA*, así como putativas secuencias Shine-Dalgarno, las cuales fueron localizadas delante de cada ORF y posibles terminadores transcripcionales, encontrando únicamente uno, Rho independiente y situado entre la primera ORF y la segunda, sugiriendo que el resto de ORFs podrían formar parte de una única unidad transcripcional u operón.

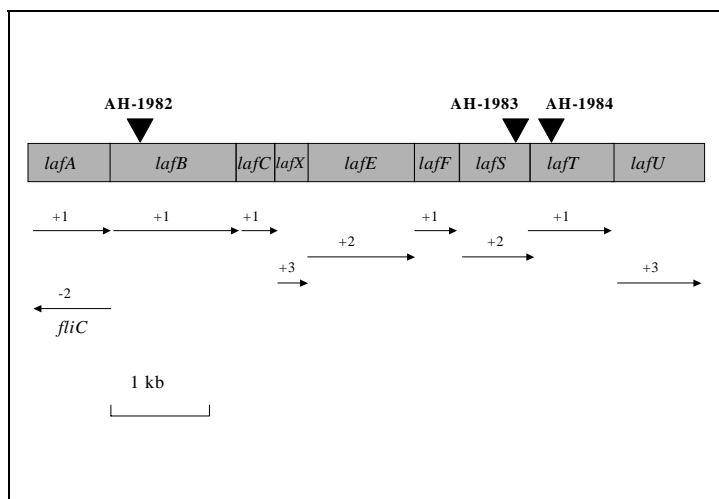


Figura 3.B.6 Organización genética del locus clonado de *A. hydrophila* AH-3. Las potenciales ORFs fueron llamadas como a sus homólogas en otras especies bacterianas. Los triángulos indican el lugar de inserción en el genoma de cada uno de los mutantes. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+1, +2, +3, -2).

3.B.1.2.3.4 Secuencia nucleotídica completa y análisis de la misma

```

1      GGACCGTTCC AAACGGTAAC GGCCAACCGG TCAGAACGTT GCTGAGCTTC
51     TGTATCTATC TGAACTATAT GGAGCTCTAT ATCAAGACCC ATCCAGAAGT
101    CGTGTTCAAA AACAGCAGTC GTGAAGGTGC TCGCATTCTG GGTACCCGCT
151    ATCACGAGGA GTTTGCCGGA TGATTGATGT CACCAGTTTC AAAACGGGGG
201    CCAAGACGCT GGCCACTATG CTGCGAGAAG GAAGGGACGA GAGTGCTTGT
251    TTTGAATGTG GCCGCTTGCT GCAATTATTG ACGCCGCTGA TGAGTCATTT
301    TCCCTGCGAG CTGCAAGTCC GTTTGGTCAC ATTGGCCAAG CAGTTGCTCC
351    AATGCCAAGA ACGGCACGAT TGGGTGGGGC TCTGTGATTA CCTAGAATAT
401    GAGTTGCCTC ACTTGCTGGA TGAGATCGAG CTGGCGCTTG CCTGAGACTA
451    TCTATCATTT TTTGCGGGGG CCAATGGCCC CACAGCTGTT TTAACATCCC
501    CATTCCCGCC TTTTGTAGCC GATCACTTAA TAAATTGTCT TCTCCGGCTC
551    AATTTTCTCC ATGCCCTGGT CGTCCTTCTA TTTTGTCTAC CTAACAAGCT
601    GCAGTGCAGC GTCTAAATCG AGGAAATAAC CATGGGCTTG TCCATTGATA
651    CCAACTTTGC TTCCATGACC ACCCAGAACC AGCTGAACTC TACCAACAAG
701    ATGCTGGGCA CCGCCATGCA GCGTCTGGGT ACCGGTCTGC GCATCAACTC
751    CGCTGCCGAC GATGCTGCCG GTCTGCAAAT CGCCACTCGT CTGCAGGCTC
801    AGTCCAATGG TCAGAAAGTG GGTATGCGCA ACGCTCAGGA TGCCATCTCT
    
```

851 ATGATCCAGA CCGCTGAAAG CGCCATGGAC GAGATGACCA ACATCACCCA
 901 GCGCATGAAA GATCTGGCTA CCCAGGCGGC CAACGGTACC AACAGCACCA
 951 AGGATCTTGA TGCCATGGAC GCCGAGTTCA AGGAACTGGG TAAAGAGCTG
 1001 GGTAACATCC GTGACAACAC CACTTTCGGC GGCAC'TTCTC TGCTGAAAAC
 1051 CGGTGGCAAA TTCCAAGCTA CTGGTGGTGT GACTT'TCCAA ATTGGTGCCA
 1101 GCGTTGATGA GAAACTTGTT TTCGATGCAT CCACCAAAGT AACCAGCGTC
 1151 AACACCGCTA TCAGTACTGC CTCTGCTGCC GCCCTGACCA CTGGTGACGC
 1201 TGCCAGATT ACTGCCATGG ACAGCATGCT GGAGAAGATC GGTGAAGCTC
 1251 GTTCTGCCTT CGGTGCCAAC ATCAACCGTC TGGAGCACAC CGTCAACAAC
 1301 CTTTCCAACA TGAAAGAGAA CACTGACATG GCGAATGGTC GCATCATGGA
 1351 TGCCGATTTT GCTCAGGAAA GCACCAATAT GACCAAGAAC CAGATGTTGA
 1401 TGCAGGCTGG CATGTCCGTT CTGTCCAAC'T CCAACCAGAT GACCGGTATG
 1451 GTAAC'TGGTC TGCTGCGT**TA** **AT**GGATTGCA TGGCCGCTCC CGTGGGGCGG
 1501 CCTTTGTCTG ATAAGGGTTT GTCGGTTGGA AAGAGTCGAA ACGGTTTTTTC
 1551 CCAACAGGCA TGCCAGTTGA GTGAATTGAA GAGGGATTAA GATGCAAATA
 1601 GATCCGGCCA CCACGGCAAT GCAACTGGTA GCTATCGAAC GCAAGAACAT
 1651 GGATGCACTG CTGAAGAAGC AGATGGATGG CATCAAAGGT CAGCAGAGTG
 1701 CGCTCAGCAC GCTCAATACA AAGCTGTCGA CTTTCCAGAC CATGCTCAAA
 1751 GATCTCAACA AGGCATCCAA TTTACAGGCG CAGAAGGCGA TTATGTCCCA
 1801 GGACGGGGTC ATGACGGTGA CGAGTAATGG CAAGGCCAGC TCGGGGCAGA
 1851 TACAATTCTT TGTGGAGCAG CCTGCCCAGT CCCATCAGAT CGGTCTCAGC
 1901 TTGGATAGTG AAACGGCCCC CCTGCCTGCG GATGGTGTCT TCTCGCTCAC
 1951 CGTCAAGGGG AAGACCATCG ACATCGATTT GGCCACCATG CCGGCAGGCT
 2001 CAACCGTCAA GGATCTGGTC TCCCACATCA ACGATGCCAA GGACAATCCC
 2051 GCGCTCAAGG CGACACTGGT CCGAACCGAC GGCAAGGTCA ACATGGTGCT
 2101 GACCAGCAAG GATAGTGGGT TGGAGAATGC CATCACGGTC AATTACCGCG
 2151 GGGATGCGAG CAATTCAC'TG GGAGCCGCGA TAAGCGGCAA GACAGACATT
 2201 ACCAAAGCTC AGGATGCCAA GTTGCGGATG GGGGGGGACA ATCCGTTGAC
 2251 CATCATCTCT GCCAGCAACA AGATCGAAAA CGTGGTGGAT GGTCTGACGC
 2301 TGCAGCTGAC CAAGGCTCAG AAGAGCGGTG ATGCCCCCTT GCTGGTCAAC

2351 ATAGAGCAGG ACAAGGAGGC AGTGACCGGC TCGCTCAAGA AGTTTGTCTGA
2401 AAGTTATAAC GAGTTGGTCG ATGAGCTGGC CAAGATGACC TCCAGCGATC
2451 CCAAGGCACC TGGAGCGCTT TCTTCCGACA GCGGGGTACG TATCCTCAAG
2501 AGCGTACTTT CTAACAGTGT GCGTGACCTG CCCAATGGTA TGAGTCTCAG
2551 CAGTCTCGGG ATCAAGACCG ACAAGGCAGG CAAGCTCTCT TTCAGTGAAA
2601 CGGATTTCAA CAAGGCGCTG GAGAAGGACC CTGAGTTACT TGGTAAGGCG
2651 CTGATGGGGG ATGATGGTCT GCTCAAACGG ATGAGTGACT CACTGGATCC
2701 TTATACCAA CGCGATGGTG CTTTGAAGGG GCGCAAGATC GGATTGGAGG
2751 CCAGTGAAAA GCGTGTAAT GAACGAATGG AAGCACTGGA TCGTCGTATG
2801 GATTCCGCGT ATTTGCGCTA TCTCAACCAG TTCACCACCA TGAACCAGAT
2851 GCTGCAGACG ATGGGCTCAC **TCTAAGCCAG** AGTCAGTCCC ACCATCCGCT
2901 GCGTCTTATT CCGAACAAGC GAGTTGTACA TGTTTGAACA CCAAGATGGC
2951 TACGATGCCT ATCAGTTTGC TGCTACTCAG GCCAAGGCAG CCAGTGCCGA
3001 TCCACATCAG CTGGTGCTGA TGCTGATGGA TGGTCTGCTT GATGAGATGG
3051 CCAGGGCGGA AGGCCATATT CTTGCCAAGC AATTTGAGCG TAAAGGGCAG
3101 ACTATCAACA AATGCCTGCA AATCCTGGGG GGA~~CT~~TGATA GTGCTCTGGA
3151 CATGGAGAAG GGCGGGGAGC TTGCAGCCAA CCTGCATCGT CTTTACGACT
3201 ACTGTGGGCA GCGTTTGT~~TT~~ GAGATCAGCG TGTCCAACGA TGTCGCCGGG
3251 TTTGCCGAGG TTCGTCTGAT TCTGCTGGAA TTAAAGGAAG GTTGGGAAGC
3301 GATGGCACAG CATCCTCGCT **AATGCGGAAG** CTATCCTTCC CCTGTTTCAA
3351 CTCGATACCG CAGCCATTAT CTGAAATTCC TCAGCTCCAT ATCTGGCCTG
3401 CTCCTTGCTA GTCGGTAAGG TCATCTTAAT TAGGGGCCAT TATCATGTCG
3451 ATGACAGAGT CTAAGCCGCT CAGCATAGAA TTCGAGACTC GCCAGCGTCA
3501 GCTGTTGGGG TTGGGTCGTC TGATCTTGCA ACAGGCGCGT GCTGGCCAAT
3551 GGGATGCTGT GCGTCTGACC GATAGCCGGT TGGCCCAATT CATTC AACAC
3601 ATGCTCAAGC AACCGGATTT GTGGTCATCA TTGGAGCCAG CCCGTGCACA
3651 GGTGCGCAAC TGGCAACAGG AGGCCTTGCT GTTATGTCAG CAAGAAACGG
3701 CACAGCGTGA GCAGGAATGG CACGATCTGT CTCGGAAACG GGAGGGGTTG
3751 CAGGCTTATG GTGAGGTACA AGAATGGGCA **TGAT**CCAGCT TGCCGGTATC
3801 GACAGTTTAA CTAGCCTCGA ATCGACCGGG TTCAACCGCC TTGCCCGTCA
3851 GCCTGACGAG CAAGGCGAAA TGTACCAACC TCTGGACCTT CCGTTTACAG

3901 AAGAACTCAT TGCCTGCCA GCAGAGGTTG TTGACGACGC GGATGCGGAT
 3951 ACTGATGTGG TCGATGCCGC GCCAGAAGAT GCGACCGAAC AATTGGAGTC
 4001 CTTACCAAC ATGCCACCCG TCTTCATCCT GAATGATGAA GTCACGAGGT
 4051 TATCATCTGC ACGACTTGCT CAGCCTGATG CGGAGATGAG CAGCGGGAAG
 4101 GAGGGAGGAA CCGTTCACGA TCGTGCTCCC TCCATATCGG TGGCATTGCG
 4151 TTCGTTGTCG GCATATGGGC GGTGCGGAGAC GGCCTACCC CATGGTGTTC
 4201 AACAGGCCAC GTTGGGCCAG GATAAACCCG TGCTCTCCAT AACTGATTTT
 4251 TCCCGAATGA TGGTGGGACA GCAAGATGCC CAGACCGGCG ACTTGCCATT
 4301 GCGCAGCAAG CTGATAGCAA GTTTGCAGCC CTTGCTGGGC AGTGAGGTGC
 4351 CAGTGGAGCA GGAACCTGTT GTACCCGAGC TCAAGGGGGC GATGGGAAAC
 4401 CTGTTGTCAT CGCCTCTTTC CAGGCCGGCG GAGTATCAAT GGGCCCCCGC
 4451 CAAGTTGGCC GATAAACCCG CGCAGTGGGG CCAGCAACTG GTAGATATGT
 4501 TGAAGGACAA GGTGAGCTC CAGGTCAATC AACAGATCAA GCAAGCACAT
 4551 ATCCGTCTTG ACCCACCTGA GCTGGGGCGG CTTGAACTGA CAGTTCGGGT
 4601 CGATGGTGAC CGTCTCAACG TTCAGCTCAA TGTAAGCAAT CCTGCTGTGC
 4651 GAGATGCATT GATCCAGTCA ATGGAGCGAC TGCGAATGAG CTTGGCCCCC
 4701 CATCATGCTG GTGGTGTGCA GGTCAATGTT GGTCAGGGAA GCGAGCAGGG
 4751 GCAGCAGGAA AAATGGCAGC AACCACAAAT CATGGCCGCG AGGCGGCAGT
 4801 GGCAAGAGGA GCTCGAGCCA ACTGACGGCA CTATGCAAGA TTGGCTGAAT
 4851 ACCCTGGTCT **GATTTTTTAT** ATCCGGCAAT AGCGAGAGTG ATTTTCATATT
 4901 ATCGGCGTG TCATGAAGTG GTTGATGGTG GTCGTGATGG CCCTGTGTCT
 4951 ATTAGCCGTA CTGGCCTATG GCGTTTATCT GAAGCGTGAT GTGGTCGCCG
 5001 TGTGGCTGGG GCTGGCCGAA CCAAGCCAG AGTTGAGTGC GACTCCATTG
 5051 TTCAAGCCGA TGGAGCGCTT TGTAATCAGT CTGGAAGGAG GCGCCGAGTC
 5101 TCATTATCTC GTGCTGGAAT TGGCTCTGGT TACTCACAAT CCGGCACAAT
 5151 TGAATACCCT CAATGAGCTG ACCCCGCTCA TCCGCAATGC GATGGTGCAG
 5201 TATTTTCAGTC ATCGTACGCA CGATGATGTG AAAAAAGAGC TGCAGAACAT
 5251 CACGGTATTG CAAGGCTCTC TGCTCGGTAA ACTGGTGATG AACTGTCAGG
 5301 GCTATGGGTA CAAGACCTAC TTGGATGAAG TGTGATCAC CAAGGTATTG
 5351 GTGCAAT**AAC** ACCGATATGA TGAATACCGA CTGGGATACG CCGCCTGAGT

5401 TTGACACATC ACCCCCTCGC ACGGGTGAGC AGGCAATATT GACTCGTTAT
 5451 CTGCCGTTAG TGAAACGGGC TGCCAGCCAC CTTTCGCAGTC AGGTCTCTGC
 5501 CTGCTTCGAT CAGGAGGATA TGGAACAGGT TGGCATGATG GGGCTGCTGG
 5551 AGGCCTGGCG TCGTTACGAT AGTGAACCGG ACCCCCAGTT TGAAAGATAC
 5601 GCCTTCAAGC GTATCCGTGG TGCCATGCTT GATGAGCTTC GGCGTCTAGA
 5651 TTGGCGGCTT CCTACACTAC GCCAGCAGGT GCACAGCCAC AATCAAGCCC
 5701 AGCGAGAGCT GTATAACCGT TTGGGACGAT CTCCTACGGA GCAGGAACTG
 5751 GCTGTGTCTC TGAATTGTAC CGTGGAAGAA GTACGCCAAT TGGCATATGC
 5801 CAGTCAGGCT GAAGCGTTAC AGAGCCTGGA AGAGTGGCTG GAGAATGGAG
 5851 GCAAGGCGCC GGCCACTGAG TCTGATGATG TCGATATGGC CATGACCATC
 5901 AGCAAGGTGC TCACCTCATT GGACAAGCGA GAGCAACTGC TGCTCTCACT
 5951 CTATTACCAG CAAGAGTTGA ATATGAAAGA GATCGCGCTG GTGTTGGGCC
 6001 TGACCGAATC ACGAGTCTGC CAATTGCACA AACAGTGCCT CCTTCAGCTC
 6051 AAGCAGCGTT TGGTCGACTC CATATAT**TAA** TGCTTCACCA CTTGTGGTGA
 6101 GGCTCCTTGA ATTCTGCGGG AGCGTT**CATG** CAAAAACAGA TTGGTCTTGG
 6151 GTCATTTTCA TTTGTGTGCT GGTGTTTCAT GATGGCGGGC GGCAAACCGA
 6201 TCGCCTTGTG GCAGCCCGCC GAGCTGATCA TCATCATAGG TGCTGCAGTC
 6251 GGCTCCATGT TTCTTGGTAA CTCGAAAGAG GTGATGCATG AGATGTGGCG
 6301 CCAGATGAGG CAGTGCTTCA AATCCAACAA GGATGAGAAA GAGATCTACC
 6351 GCGAGTTGCT GACCTTGATG CATCAATTGC TGGAGGAGAC CCGCAATAAG
 6401 GGCATGAAGG CACTCGATGA ACATATTGAG AATCCACAAC AGAGCTCAGT
 6451 ATTTTTGATG TATCCCCAGA TATCGGAAGA TCCTCAACTG CTCGGTTTCA
 6501 TCATCGATAA TTTGCGTTTA CTGGGAATGG GCAAGATTAC GCCTCATGAG
 6551 CTGGATACCA TGCTGGAGCA GGAGATCATG GCTATTGAAG AGGACATGCT
 6601 CAAACCGGCA CATGCCCTGC ACAAGACGGG CGAGGCATGC CCAGGGTTTCG
 6651 GTATTCTGGC TGCGGTGATG GGGATCATCA TCACCATGCA GCAGCTGGAT
 6701 GGCCCTTTGA GCAATATCGG TGTACATGTC GCGGCCGCAT TAGTGGGAAC
 6751 CTTTCATCGGC ATCTTCCTCT GCTACTGTCT GCTGGAGCCC ATCAGCAACG
 6801 CCATGGAGGA GATGGTCAAG CGTCGAATAG GGCTGCTGAT GTGCATAAAA
 6851 TCTATTCTGA TCGCCCAGCT TCGTGGAAG ACCCCGCTCA TCTCGGTCGA
 6901 TTCGGGTCGC AAGATGTTGG AGCCTGACGA TAAACCCAGC TTCCTTGAAT

6951 TGAAGAGTG GGTGACAAAC AGGGCCATGT AATGCGCAAT CACGAGCAGA
 7001 TCATCATCAA ACGCCAGCAA CGGCGTAACA GCGCGCCCAA GGGGGGTGGG
 7051 GCCTGCAAAG TGGCCTTTGC CGACTTCACC CTGGCGATGA TGGCATTTTT
 7101 CATGGTGTTA TGGATCCTGG CTGTCTCAAG TCAAGAGGAG CGTGAGGTCG
 7151 TCGCCAGACG CCTGCGTGAC TACAGCATCA TGGACAGTGA AGCCAATCCG
 7201 TTCGATATCC GCAACAGCCC CTACCCGGTG GATCTGGGAG GCAACCTATC
 7251 CGTGCTGGAC GAGCTAAGCC CCAAGTTTGT CGAGGAAGGG CAGCGGATGC
 7301 CAAAGCATAT GGAGCGGAAT CGCAGCATCT TTTCTGATGG GGCCAGCGGC
 7351 GGTTACGAGA ACCTGCTGGT GGGGAAAATT GAAGGTGAGG CACAGATGAA
 7401 GCAACTGGCC GGTTCATTGG CTCGTTGGCC GATCAGATGC AAGTCAAGAA
 7451 CAACCTTGAG CTGCAACTGG TACCGCAAAG GTTTGAGGAT CCTCATTCGC
 7501 GATGATGATG AGCGCGAGAT GTACAGCCGT GGCAGCGCCC GGATCAGTCC
 7551 CTTCTTCCGG CATATGCTGA TGGCGTTGGC CCCTATATTT CAGCGAGTTG
 7601 AAAACCGAGT CATGATCTCG GGCCACACCG ATAGCACCCC CTTTGCGGGT
 7651 GACAACTACA GCAACTGGGA GCTTTCATCT GATCGTGCCA TGATGGCAAG
 7701 GCGAGTCTTG CTTGCCGGAG GCATGCCCCC AGAGCGGGTG GGGCAGGTCG
 7751 CAGCCATGTC AGATAACATG CTGGAGAATA CAGCCGATCC ACGAGGCAGC
 7801 CAAAATCGCC GTATTGAACT GCTGGTGATG ACAAGCCAGG CGGAAAAGAA
 7851 TCTGGAACAA TGGTTCAGTG CGCAAACGCA AACTGCGGTG AAGCAAGCCA
 7901 TGGACGACAC TTCTCATGGA CAACCTTGAA ATGGACCTGC CGGGATCGGA
 7951 TAAACTGAGC GATCCTCGGC GTAAGGTCCC TCGCTGGTAC CTGCATGATG
 8001 GTAGTACCCC TCTGGAGTCA CAAAGCTGTG GTATTGCTGC CCGTCTCATG
 8051 GTGTCGGGTC TTCTGTTCGA TAAGAGTATC GGCCGGGCTG TGATCAAGGA
 8101 TATAGGGCCG GGGGGGGTTG GTTTTCTGGC TCCTGCACGC TTTATCCTGC
 8151 CCGAGATTGT CAGTCTGTCA CTCTCCCCGC GTATTGTGCT GGATTGCCAA
 8201 ATCACCCATC GACGTTCAAT TGGTCAATAC CTGAGCTTCT ATGGCGCCCCG
 8251 TTGGTCAGAT CCAGAATCGG TAGACCTGTC GCCAGTGCTC AGTCATTGGC
 8301 GACACTGCTT CATGGTGTCG GGAGGGGTCG CTTCTGTCTC AGCCCCAGTG
 8351 GATCTGTTAA CGACTCCAGT CTGATAGCGC CACGACTCAT ATCCATATCC
 8401 AGCCCTCTTG CTGCATGCAG CAGCAAGGGA TCGTGCAAGC TTTCCAATGA

8451 AATGGCTTTT TGAAGCAGGA TCTGCCCCTT TTTGGTGACT GGGAGAGGGG
8501 ATTTCCCACG GCTATAGACG ATGGGACAGT TGGTTACTCC GGGTACGTTG
8551 GGCAG

Figura 3.B.7 Secuencia nucleotídica contenida en el cósmido pCOS-LAF. Los codones de inicio así como los codones de parada de las nueve pautas de lectura abierta establecidas se han marcado subrayando y en negrita respectivamente. El putativo promotor está también subrayado delante de *lafA*. El inicio de transcripción sería el nucleótido marcado con la letra más grande.

Las principales características de cada una de las ORFs se pueden resumir en la tabla 3.B.1, así como su localización en la secuencia nucleotídica de la figura 3.B.7.

| ORF | Posición | %G+C | Proteína codificada | | pI ^a | GRAVY ^b |
|-------|-----------|------|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | aa | KDa ^a | | |
| ORF-1 | 632-1471 | 65,4 | 279 | 29,489 | 5,47 | -0,294 |
| ORF-2 | 1592-2875 | 69,4 | 427 | 45,813 | 7,70 | -0,359 |
| ORF-3 | 2930-3322 | 55,7 | 130 | 14,553 | 5,13 | -0,279 |
| ORF-4 | 3445-3783 | 60,2 | 112 | 13,202 | 6,11 | -0,762 |
| ORF-5 | 3774-4862 | 60,9 | 362 | 39,644 | 4,45 | -0,424 |
| ORF-6 | 4901-5359 | 65,4 | 152 | 17,197 | 8,67 | 0,352 |
| ORF-7 | 5367-6080 | 60,5 | 237 | 27,478 | 5,17 | -0,567 |
| ORF-8 | 6128-6982 | 67,4 | 284 | 31,894 | 5,57 | 0,171 |
| ORF-9 | 6982-7929 | 66,1 | 315 | 35,689 | 8,99 | -0,499 |

Tabla 3.B.1 Principales características de las 9 ORF localizadas en la secuencia nucleotídica y su ubicación en la misma.

a: Punto isoelectrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de Expasy.

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle (Kyte and Doolittle, 1982)

3.B.1.2.3.5 Análisis de las diferentes ORFs

ORF1

La ORF1 codifica para una proteína de 279 aminoácidos, localizada a la cabeza del locus *laf* de *A. hydrophila* AH-3. Detallamos a continuación las proteínas que mostraron mayor homología con el producto de traducción de la ORF1, que fueron LafA de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 68% y de identidad del 59%; la flagelina de *Bacillus thuringiensis* (Lovgren y col., 1993), con un 59% de similaridad y un 38% de identidad y la flagelina de *Pseudomonas putida* (Senapin y col., 1998) con un porcentaje de similaridad del 56% y de identidad del 40%.

LafA de *V. parahaemolyticus* codifica para la flagelina de los múltiples flagelos laterales formados tras la inducción del crecimiento sobre superficies sólidas, e independiente de las flagelinas polares del mismo organismo (McCarter and Wright, 1993). Así mismo, las flagelinas de los microorganismos *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas putida* presentan una importante homología con la presunta flagelina lateral de *A. hydrophila* AH-3.

Por la secuencia amino terminal obtenida a partir de la flagelina lateral purificada de *A. hydrophila* AH-3, podemos confirmar que se trata de la secuencia nucleotídica de la misma. (Ver Figura 3.B.3).

Tal como era de esperar, LafA de *A. hydrophila* pertenece a la gran familia de las flagelinas según los resultados del programa pFAM del Sanger Center, mostrando dos dominios altamente conservados, el dominio N-terminal (aminoácidos 29 a 176) y el dominio C-terminal (aminoácidos 186 a 257).

Tal como indicamos previamente, se denominó LafA a la ORF1.

MGLSIHTNFASMTTQNLNSTNKMLGTAMQRLGTGLRINSAADDAAGLQIATRLQAQSNQ
 QKVGMRNAQDAISMIQTAESEAMDEMTNITQRMKDLATQAANGTNSTKDLAMDADFELG
 KELGNIRDNTTFGGTSLKKTGGKFQATGGVTFQIGASVDEKLVFDASTKVTSVNTAISTA
 SAAALTTGAAAQITAMDSMLEKIGEARSAFGANINRLEHTVNNLSNMKENTDMANGRIMD
 ADFAQESTNMTKNQMLMQAGMSVLSNSNQMTGMVTGLLR

Figura 3.B.8 Secuencia traducida en aminoácidos de LafA de *A. hydrophila*. Los aminoácidos subrayados se corresponden con la secuencia N-terminal obtenida a partir de la proteína purificada.

ORF1'

Curiosamente, la secuencia nucleotídica de la ORF1 muestra una ORF parcial transcrita en dirección opuesta cuya secuencia en aminoácidos es similar a una flagelina de *Pseudomonas aeruginosa*, FliC, (Totten y Lory, 1990). En la mencionada secuencia, sin embargo, no se localizan ni el codón de inicio ni el de parada, así como tampoco ninguna secuencia Shine-Dalgarno.

ORF2

La siguiente ORF que encontramos en la secuencia nucleotídica, a 120 nucleótidos del codón de parada de LafA, es la ORF2, que codifica un producto de 427 aminoácidos, el cual muestra homología principalmente con LafB de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 56% y de identidad del 37%; FliD de *Pseudomonas aeruginosa* (Arora y col., 1998, 2000) con un 53% de similaridad y un 33% de identidad y la proteína asociada al gancho flagelar (HAP2) de *Escherichia coli* (Kawagishi y col., 1992) con un porcentaje de similaridad del 49% y de identidad del 28%.

LafB es la proteína situada a continuación de LafA en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, que desempeña la función de “capuchón” del filamento, previniendo la pérdida de flagelina no polimerizada. También es llamada HAP2, del inglés “Hook-associated protein”, (McCarter and Wright, 1993). Del mismo modo, ésta es la función de las proteínas FliD de *P. aeruginosa* o *E. coli* respectivamente, aunque en ambos casos no exista más que un tipo de flagelación.

La mutación de AH-1982 se localiza en esta ORF, concretamente entre los nucleótidos 1970 y 1971 (Figura 3.B.7).

Tal como indicamos previamente, se denominó LafB a la ORF2.

```
MQIDPATTAMQLVAIERKNMDALLKKQMDGIKQQSALSTLNTKLSTFQTMLKDLNKASN
LQAQKAIMSQDGVMTVTSNGKASSGQIQFFVEQPAQSHQIGLSLDSETAPLPADGVFSLT
VKGKTIDIDLATMPAGSTVKDLVSHINDAKDNPGVKATLVRTDGKVNMLVTSKDSGLENA
ITVNYRGDASNSLGAAISGKTDITKAQDAKLRMGDNPLTIISASNKIENVVDGLTLQLT
KAQKSGDAPLLVNI EQDKEAVTGSLKKFVESYNELVDELAKMTSSDPKAPGALSSDSGVR
ILKSVLNSVRLPNGMSLSSLGIKTDKAGKLSFSETDFNKALEKDPELLGKALMGDDGL
LKRMSDSLDPYTKRDGALKGRKIGLEASEKRVNERMEALDRRMSAYLRYLNQFTTMNQML
LQTMGSL
```

Figura 3.B.9 Secuencia traducida en aminoácidos de LafB de *A. hydrophila*.

ORF3

A continuación de LafB encontramos la ORF3 (con 55 nucleótidos entre ambas secuencias) que codifica un producto de 130 aminoácidos, mostrando homología principalmente con LafC de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un

porcentaje de similaridad del 59% y de identidad del 47%; FliS de *Salmonella typhimurium* (Kawagishi y col., 1992) con un 56% de similaridad y un 38% de identidad y FlaJ de *Aeromonas caviae* (Rabaan y col., 2001) con un porcentaje de similaridad del 59% y de identidad del 34%.

LafC es la proteína situada a continuación de LafB en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, que desempeña su función en la elongación del filamento, (McCarter and Wright, 1993), probablemente ejerciendo de chaperona que facilita la exportación de flagelina (Yokoseki y col., 1995). Del mismo modo, ésta es la función de las proteínas FliS (nombre que recibe la mencionada proteína en la mayoría de especies) de *S. typhimurium* o FlaJ de *A. caviae* respectivamente, aunque en estos casos la función se desempeñe en el único tipo de flagelo en el caso de *S. typhimurium* o en el flagelo polar de *A. caviae*.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafC a la ORF3.

```

MFEHQDGYDAYQFAATQAKAASADPHQLVLMMLMDGLLDEMARAEGHILAKQFERKGQTIN
KCLQILGGLDSALDMEKGGELAANLHRLYDYCGQRLFEISVSNDVAGFAEVRRIELLEKE
GWEAMAQHPR

```

Figura 3.B.10 Secuencia traducida en aminoácidos de LafC de *A. hydrophila*.

ORF4

La siguiente ORF localizada en la secuencia, a 132 nucleótidos del codón de parada de LafC, es la ORF4, transcrita en diferente pauta de lectura que las tres anteriores y en este caso, aunque codifica para una putativa proteína de 112 aminoácidos, no muestra homología alguna con genes flagelares tal y como se esperaría, lo que nos obliga a calificarla como proteína de función desconocida que llamaremos LafX. En *V. parahaemolyticus* encontramos en su lugar la proteína LafD, cuyo peso molecular es aproximado al de LafX (McCarter and Wright, 1993), sin embargo, ni existe homología entre ellas ni se ha descrito función alguna para LafD.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafX a la ORF4.

```

MSMTESKPLSIEFETRQRQLLGLGRLILQQARAGQWDAVRLTDSRLAQFIQHMLKQPDWL
SSLEPARAQVRNWQQEALLLCQQETAQREQEWHDL SRKREGLQAYGEVQEWA

```

Figura 3.B.11 Secuencia traducida en aminoácidos de LafX de *A. hydrophila*.

ORF5

A continuación de LafX encontramos la ORF5, con 7 nucleótidos cabalgados sobre la ORF4, pero transcrita en diferente pauta de lectura. Ésta codifica una putativa proteína de 362 aminoácidos, y muestra su mayor homología con LafE de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 53% y de identidad del 37%; FliK de *Vibrio parahaemolyticus* (Jaques y col., 2000) con un 64% de similaridad y un 38% de identidad y FliK de *Escherichia coli* (Kawagishi y col., 1996) con un porcentaje de similaridad del 39% y de identidad del 25%.

LafE es la proteína situada a continuación de LafD en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, y su función es controlar la longitud del gancho, (McCarter and Wright, 1993). Del mismo modo, ejercen esta función las proteínas FliK de *V. parahaemolyticus*, sobre el flagelo polar, o *E. coli*, en su único tipo de flagelo peritrico, especie en la que se ha descrito FliK como una proteína no perteneciente a la familia axial de proteínas flagelares (Kawagishi y col., 1996).

Tal como indicamos previamente, se denominó LafE a la ORF5.

```
MGMIQLAGIDSLTSLESTGFNRLARQPDEQGEYQPLDLPFTEELIALPAEVVDDADADT
DVVDAAPEDATEQLESFTNMPPVFILNDEVTRLSSARLAQPDAMSSGKEGGTVHDRAPS
ISVALRSL SAYGRSETALPHGVEQATLGQDKPVL SITDFSRMMVGGQDAQTGDLPLRSKL
IASLQPLL GSEVPVEQEPVPELKGAMGNLLSSPLSRPAEYQWAPAKLADNPAQWGQQLV
DMLKDKVELQVNQQIKQAHIRLDPELGRLELTVRVDGDRNLNVQLNVSNPAVRDALIQSM
ERLRMSLAPHHAGGVEVNVGGQSEQGGQEKWQQPQIMAGRRQWQEELEPTDGTMDWLNT
LV
```

Figura 3.B.12 Secuencia traducida en aminoácidos de LafE de *A. hydrophila*.

ORF6

La ORF6 sucede a LafE en la secuencia nucleotídica, con 38 nucleótidos entre ambas secuencias. Se transcribe en diferente pauta de lectura que la ORF5 y codifica un producto de 152 aminoácidos, el cual muestra homología con LafF de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 61% y de identidad del 28% y con FliL de *Pseudomonas putida* (Segura y col., 1999).

LafF es la proteína situada a continuación de LafE en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, y aunque su función es desconocida, al igual que la proteína FliL en otras especies bacterianas, está involucrada en la síntesis flagelar, al parecer en forma de proteína de membrana (McCarter and Wright, 1993). Los resultados obtenidos en el programa pSORT de ExPASy confirman la localización de nuestra proteína LafF en la membrana citoplasmática, localizando un dominio transmembrana entre los aminoácidos 2-28.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafF a la ORF6.

MRRVMKWLMMVVMMALCLLAVLAYGVYLKRDVVAVWLGLAEPKPELSATPLFKPMERFVIS
LEGGAESHYLVLELALVTHNPAQLNTLNELTPLIRNAMVQYFSHRTHDDVKKELQNITVL
QGSLLGKLVMTLQGYGYKTYLDEVLTITKVLVQ

Figura 3.B.13 Secuencia traducida en aminoácidos de LafF de *A. hydrophila*.

ORF7

En los 7 nucleótidos posteriores al codón de parada de LafF, encontramos la ORF7 y codifica una putativa proteína de 237 aminoácidos, transcrita en diferente pauta de lectura, la cual muestra sus más altas homologías con LafS de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 53% y de identidad del 38%; factor sigma de la ARN polimerasa de *Pseudomonas aeruginosa* (Starnbach y Lory, 1992), con un 52% de similaridad y un 34% de identidad y FliA, sigma 28 de *Xenorhabdus nematophilus* (Lanois y Givaudan, 1998) con un porcentaje de similaridad del 53% y de identidad del 36%.

Se trata en todos los casos de la subunidad σ^{28} de la ARN polimerasa, imprescindible como factor de la iniciación de la transcripción y específico de operones flagelares, siendo la proteína situada a continuación de LafF en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, y mostrando tal y como describen McCarter y Wright, (1993), 2 regiones conservadas que podrían ser importantes en el reconocimiento del promotor, específico de las subunidades σ de la ARN polimerasa.

El alineamiento de las secuencias de cada una de las proteínas homólogas a nuestra ORF7 muestra efectivamente dos regiones consensus.

| <u>Región I</u> | |
|------------------|---|
| AHYLAFS | R I R G A M L D E L R R L D W R |
| VPALAFS | R V R G A I L D E L R R L D W R |
| PSEFLIA | R I R G A M L D E V R K G D W A |
| XNEFLIA | R I R G A M L D E L R S R D W A |
| CONSENSUS | R - R G A - L D E - R D W |
| <u>Región II</u> | |
| AHYLAFS | L D K R X X X X X X X X X X X N M K E I A L V L G L T E S R V C Q L H |
| VPALAFS | L S K R D Q L L L T L F Y Q H E L N L H E I A L V L D L T P P R I C Q L H |
| PSEFLIA | L P E R E R L V L A L Y Y D E E L N L K E I G E V L G V S E S R V S Q L H |
| XNEFLIA | L P E R E K M V L T L Y Y Q E E L N L K E I G A V L N V G E S R V S Q L H |
| CONSENSUS | L R - - - - N - - E I V L - - R - Q L H |

Figura 3.B.14 Alineamiento de las dos regiones conservadas entre los factores sigma de *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa* y *X. nematophilus*. Representamos en la secuencia consensus con un guión aquellos aminoácidos que sólo difieren en una de las secuencias (marcados en rojo).

Además, LafS pertenece a la gran familia de factores de transcripción sigma 70, según los resultados del programa pFAM del Sanger Center, poseyendo un dominio conservado que engloba los aminoácidos 18 a 230.

La inserción del mini-Tn5 en el mutante AH-1983 se localiza entre los nucleótidos 5965 y 5966 (Figura 3.B.7) de la ORF7.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafS a la ORF7.

```
MMNTDWDTPPEFDTSPPTGEQAILTRYLPLVKRAASHLRSQVSACFDQEDMEQVGMGL  
LEAWRRYDSEDPQFERYAFKRIRGAMLDELRRLDWRLPTLRQQVHSHNQAQRELYNRLG  
RSPTEQELAVSLNCTVEEVRLAYASQAEALQSLEEWLENGGKAPATESDDVDMAMTISK  
VLTSLDKREQLLLSLYYQQELNMKEIALVLGLTESRVCQLHKQCVLQLKQRLVDSIY
```

Figura 3.B.15 Secuencia traducida en aminoácidos de LafS de *A. hydrophila*.

ORF8

La ORF8 sucede a LafS en la secuencia nucleotídica, a una distancia de 46 nucleótidos desde el codón de parada de la ORF7 y transcrita en diferente pauta de lectura que ésta. La secuencia codifica para un producto de 284 aminoácidos y muestra homología en primer lugar con la proteína LafT de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 72% y de identidad del 52%; así como con la proteína MotA de diferentes especies bacterianas, entre ellas *Escherichia coli* (Dean y col., 1984), con un porcentaje de similaridad del 61% y con un 37% de identidad y *Salmonella typhimurium* (Togashi y col., 1997) con un porcentaje de similaridad del 62% y de identidad del 37%.

LafT sucede a la proteína LafS en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), y se trata de uno de los dos componentes del motor flagelar lateral con homología a MotA de *E. coli*. Dicho motor está conducido por el flujo de protones como en la mayoría de motores flagelares conocidos y a diferencia del motor del flagelo polar en la misma cepa, el cual funciona por el paso a través de la membrana de iones sodio (Atsumi y col., 1992).

En *E. coli* y *S. typhimurium*, MotA es también el componente conductor de protones del motor, junto con MotB, proteína a la cual se encuentra unida formando ambas el “stator” del motor flagelar, el cual además de formar el canal que conduce los protones al interior celular, anclan el motor a la célula. MotA contiene cuatro dominios transmembrana, el primero es el menos conservado mientras que el tercero y el cuarto son altamente conservados, esto sugiere que estos dos últimos junto con el segundo, sean los más importantes funcionalmente, formando propiamente el canal junto con MotB. Los dominios III y IV tienen ambas secuencias identidad, encontradas únicamente

en miembros de la familia MotA (MotA y sus homólogos en otras especies), (Nguyen and Saier, 1996).

Dominio III: (G, A, T) X G (L, I, V, M)₂ (A, G) (A, T) (L, I, V, M) X G (L, I, V)₂

Dominio IV: (L, I, V) G X₂ (L, I, V, M) (S, A) X A (L, I, V, M, F) (L, I, V) (T, A, G) T
(L, I, V, M, F) X G

Figura 3.B.16 Secuencias identidad de los dominios III y IV de la familia de proteínas MotA (proteínas MAF). Entre paréntesis están representados los posibles aminoácidos que se pueden encontrar en la posición dada.

Los resultados obtenidos en el programa pSORT de ExPASy muestran tres dominios transmembrana en nuestra proteína LafT en lugar de cuatro, aunque dicha proteína carece del primero, y por lo tanto menos importante funcionalmente, de los dominios MotA. Los dominios III y IV muestran ciertamente la señal identidad de la familia. En la figura 3.B.17 mostramos la secuencia de los tres dominios.

La inserción del mini-Tn5 en el mutante AH-1984 se localiza entre los nucleótidos 6239 y 6240 (Figura 3.B.7) de la ORF8.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafT a la ORF8.

MQKQIGLGSSFSFVCWCFMMAGGKPIALWQPAELIIIIIGAAVGSMLGNSKEVMHEMWRQM
RQCFKSNKDEKEIYRELLTLMHQLLEETRNGMKALDEHIENPQQSSVFLMYPQISEDPO
LLGFIIDNLRLLGMGKITPHELDTMLEQEIMAI EEDMLKPAHALHKTGEACP**GFGILAAV**
MGIIITMQQLDGPLSNIGVHVAAALVGTFIGIFLCYCLLEPISNAMEEMVKRRIGLLMCI
KSILIAQLRGKTPLISVDSGRKMLEDVKPSFLELEEWVTNRAM

Figura 3.B.17 Secuencia traducida en aminoácidos de LafT de *A. hydrophila*. Las secuencias subrayadas se corresponden a los tres dominios transmembrana existentes; los aminoácidos en negrita forman la secuencia identidad de los dominios III y IV de MotA.

ORF9

Con el codón de inicio ATG solapado al codón de parada de la ORF8 encontramos la ORF9, transcrita en diferente pauta de lectura. La secuencia codifica para un producto de 315 aminoácidos y muestra homología con la proteína LafU de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 55% y de identidad del 37%; así como con la proteína MotB de diferentes especies bacterianas, entre ellas *Pseudomonas aeruginosa* (Stover y col., 2000), con un porcentaje de similaridad del 56% y con un 34% de identidad y *Escherichia coli* (Stader y col., 1986) con un porcentaje de similaridad del 52% y de identidad del 33%.

LafU es también adyacente a LafT en el locus del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), y se trata del segundo componente, junto con MotA, del motor flagelar lateral, con homología a MotB.

MotB es en *E. coli*, así como sus homólogos en otras especies, el segundo componente del “stator” del motor flagelar, interaccionando con MotA mediante su pequeño dominio transmembrana amino terminal, y a la vez con el peptidoglicano a través de un gran dominio extracitoplasmático. Los alineamientos entre diferentes especies han permitido encontrar la secuencia identidad de la familia MotB, dentro de su único dominio transmembrana (Nguyen and Saier, 1996).

W X (L, I, V, M, A, F) (T, P, A) (F, Y) (A, T) D (L, I, V, M, A, F)₂ X₂ (L, I, V, M, A, F)₄
F (L, I, V, M, A, F)₃

Figura 3.B.18 Secuencia identidad del único dominio transmembrana de la familia de proteínas MotB (proteínas MBF). Entre paréntesis están representados los posibles aminoácidos que se pueden encontrar en la posición dada.

Los resultados obtenidos en el programa pSORT de ExPASy muestran un solo dominio transmembrana en nuestra proteína LafU, y éste muestra, a excepción de dos aminoácidos, la secuencia identidad de la familia. En la figura 3.B.19 mostramos la secuencia de dicho dominio, en posición amino terminal.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafU a la ORF9.

MRNHEQII I I K R Q Q R R N S A P K G G G A C **K V A F A D F T L A M M A F F M V L** W I L A V S S Q E E R E V V A R R
L R D Y S I M D S E A N P F D I R N S P Y P V D L G G N L S V L D E L S P K F V E E G Q R M P K H M E R N R S I F S D G
A S G G Y E N L L V G K I E G E A Q M K Q L A G S L A R W P I R C K S R T T L S C N W Y R K G L R I L I R D D D E R E M
Y S R G S A R I S P F F R H M L M A L A P I F Q R V E N R V M I S G H T D S T P F A G D N Y S N W E L S S D R A M M A R
R V L L A G G M P P E R V G Q V A A M S D T M L E N T A D P R G S Q N R R I E L L V M T S Q A E K N L E Q W F S A Q T Q
T A V K Q A M D D T S H G Q P

Figura 3.B.19 Secuencia traducida en aminoácidos de LafU de *A. hydrophila*. La secuencia subrayada se corresponde con el dominio transmembrana existente; los aminoácidos en negrita forman la secuencia identidad de dicho dominio de MotB.

3.B.1.3 Caracterización del locus del flagelo lateral de *A. caviae* Sch3N

3.B.1.3.1 Clonaje de las flagelinas laterales de *A. caviae* Sch3N

3.B.1.3.1.1 Obtención de sonda

A partir de la secuencia aminoacídica deducida del extremo amino terminal de la flagelina de *A. caviae* Sch3N, se diseñó un cebador degenerado y marcado con digoxigenina, para utilizarlo como sonda. Dicho cebador se correspondía concretamente con la secuencia en aminoácidos HTNFAS.

3.B.1.3.1.2 Hibridación sobre digestiones de ADN cromosómico

Con el objetivo de acotar la zona del ADN cromosómico de *A. caviae* Sch3N que contenía la flagelina lateral, se realizaron digestiones totales del mencionado ADN con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bam*HI respectivamente, para realizar posteriormente un Southern blot con la sonda obtenida. Tras el revelado, se obtuvo hibridación positiva a una altura de 1 kb para la restricción *Pst*I así como en los fragmentos de aproximadamente 4 kb en la restricción *Bam*HI.

3.B.1.3.1.3 Hibridación de una minilibrería de *A. caviae* Sch3N-*Pst*I

Con los datos obtenidos del Southern blot, se procedió a preparar una librería genómica que contuviese fragmentos de entre 0,8-1 kb resultantes de la digestión del ADN cromosómico de Sch3N con *Pst*I. Ésta se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Se procedió entonces a la hibridación de la misma mediante colony blot haciendo uso de la sonda del extremo N-terminal de la flagelina lateral. Se aisló de este modo el plásmido pARLA20, correspondiente a un fragmento de 1 kb *Pst*I en el plásmido pUC19.

3.B.1.3.1.4 Secuenciación del clon pARLA20

El plásmido pARLA20 fue secuenciado usando de punto de partida los oligonucleótidos cebadores complementarios a cada uno de los extremos del vector pUC19, alrededor de la diana *Pst*I del mismo.

Una vez obtenida la secuencia, se procedió a contrastarla con diferentes bases de datos de ADN o proteínas además de buscar posibles pautas de lectura abierta. Se consideraron de este modo 2 ORFs, ambas parciales, potencialmente significativas cuyos productos de traducción, según las homologías encontradas con otras proteínas, mostraban en ambos casos similitud con la flagelina lateral, LafA, de *V.*

parahaemolyticus (McCarter and Wright, 1993). Cada una de nuestras ORFs recibió por homología el nombre de LafA1 y LafA2 respectivamente.

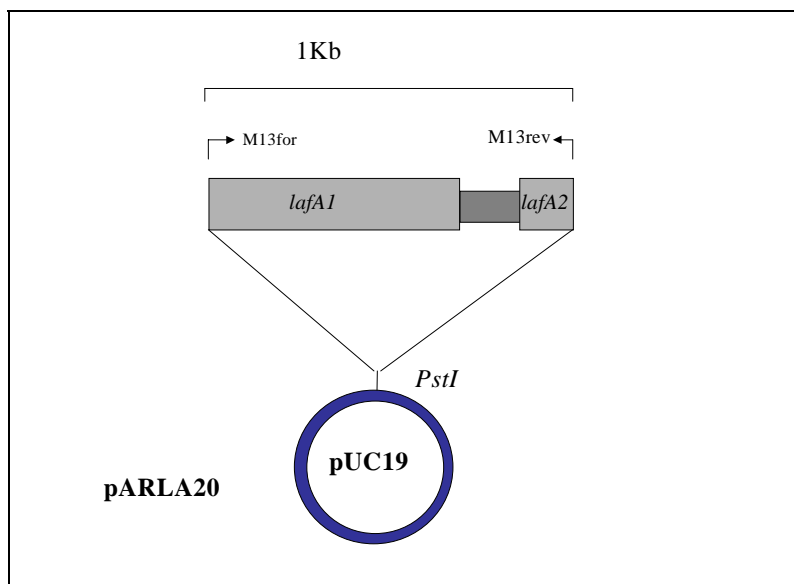


Figura 3.B.20 Gráfico de la secuencia de Sch3N clonada en pUC19.

3.B.1.3.1.5 Inserción de un determinante de resistencia a kanamicina en una flagelina lateral de *A. caviae* Sch3N

Con el objetivo de obtener un mayor fragmento de secuencia de los genes del flagelo lateral de *A. caviae* Sch3N, se pretendían clonar los fragmentos de restricción del ADN cromosómico de 4 kb obtenidos con *Bam*HI, e intentando optimizar el clonaje de los mismos, se obtuvo un mutante en LafA1 por la inserción de un determinante de resistencia a kanamicina derivado de pUC4-KIXX, en la diana de restricción *Hinc*II. Tal y como se describe en Material y Métodos, la metodología empleada nos permitió obtener mediante intercambio alélico, una sustitución de la copia salvaje de LafA1 de *A. caviae* Sch3N por la copia con el determinante de resistencia a kanamicina insertado. De este modo generamos el mutante AAR58.

3.B.1.3.1.6 Hibridación de una minilibrería del mutante AAR58-*Bam*HI

Con los datos obtenidos del Southern blot para la digestión *Bam*HI del ADN cromosómico de Sch3N, deducimos que el mismo fragmento en el mutante AAR58 tendría alrededor de 5,0-6,5 kb y por ello se procedió a preparar una librería genómica que contuviese fragmentos de dicha medida. Ésta se realizó tal y como se describe en Material y Métodos. Se procedió a la hibridación de la misma mediante colony blot haciendo uso de la sonda del extremo N-terminal de la flagelina lateral. Se aisló de este

modo el plásmido pARL1, correspondiente a un fragmento de 6 kb *Bam*HI del mutante AAR58 en pUC19.

3.B.1.3.1.7 Secuencia del clon pARL1

El plásmido pARL1 fue secuenciado usando de punto de partida los oligonucleótidos cebadores complementarios a las secuencias ya obtenidas anteriormente contenidas en el plásmido pARLA20, así como los cebadores M13 for y M13 rev complementarios a las secuencias que flanquean el lugar de clonaje múltiple del vector pUC19. De los tramos de secuencia obtenidos se fueron diseñando los cebadores necesarios para secuenciar progresivamente todo el ADN contenido en el plásmido pARL1. Los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación se pueden encontrar en Material y Métodos.

Una vez obtenida la secuencia, se procedió al análisis preliminar de la misma. Se detectaron las posibles ORFs descartando aquellas menores de 100pb. Se consideraron de este modo 4 ORFs potencialmente significativas y sus productos de traducción fueron sometidos a una comparación frente a diferentes bases de datos de secuencias de ADN o proteínas para localizar aquellas que mostraran similitud con genes previamente descritos. Además se buscaron promotores delante de cada una de las ORFs encontrando únicamente putativos σ^{54} , cuya secuencia consenso es GG-N₁₀-GC, precediendo el inicio de los genes *lafA1* y *lafB*, así como putativas secuencias Shine-Dalgarno, las cuales fueron localizadas delante de cada ORF, y terminadores transcripcionales, encontrando posibles terminadores Rho independientes tras el codón de parada de ambas flagelinas.

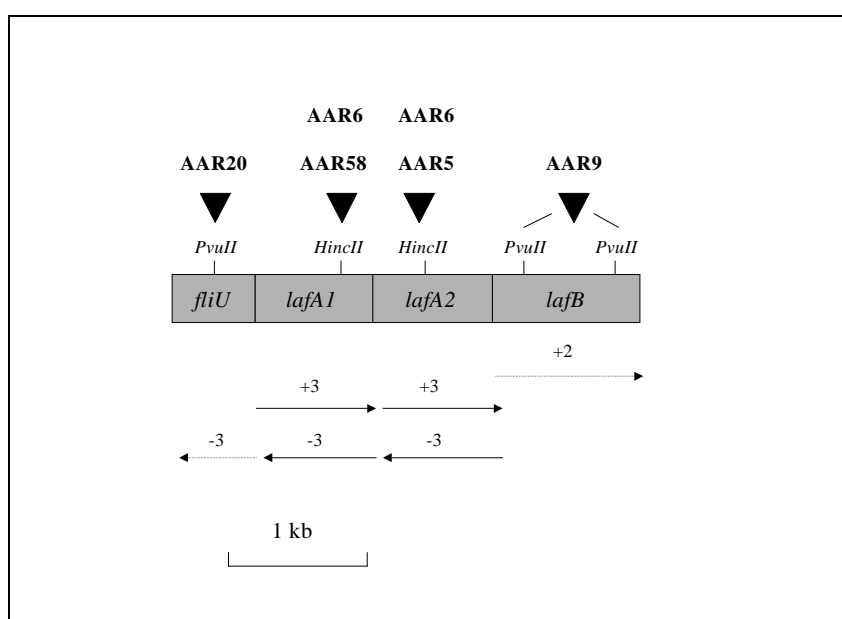


Figura 3.B.21 Organización genética del locus clonado de *A. caviae* Sch3N. Las potenciales ORFs fueron llamadas como a sus homólogas en otras especies bacterianas. El triángulo indica el lugar de inserción en el genoma del mutante AAR58. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+2, +3, -3), discontinua si la misma no está completa. En cada mutante están señaladas las dianas de restricción utilizadas.

3.B.1.3.1.8 Secuencia nucleotídica completa y análisis de la misma

```

1   GTTGATTCTGA GCTCTGTACC GGGGACCCGG TGGATCAGCA TGCCGACCAG
51  CCATAGCCGA ATCGCCACGG GGATATCCGT GGCGGCCAGC ACGTGAATGC
101 TCAGGCTGTG CAACGTCGCC ATGGCGTTGG AGGGAGGCGG AACGAAGGGC
151 AGGGGCTGGG TGAGCTCGGT GACCTCGGTC TGCATCGCCA GGGGGTCAAG
201 CAGCAACTGG CGGCACACCT GGGGCGAGGA GAGCATCAGG GACCTCTTGA
251 GCTGGTTGCC GATGCGGGTC TGGGCTCTGG GGTAAGTCTT GCAGGTGTGA
301 CTCAGGGCAT CCGGACCCGC CTTGCTGTGG ATCTGGCACA GCGGTTTTC
351 ATCGAGGAAG GGGCAGGCGC CCTGTTCTGC GAGCTTTATC TCCCCCAGC
401 GCTCGTTGCT CTGCTTCACC TTGATGATGT GCAGCTTGCT CAGGGATTTG
451 ACAGTGGGGT CGGGGTGGCG TTCATAGCTG CGGAAGGTCT GCTTGTCGAT
501 GCTGATGGTC CAGCTGTGGC AGCAGTTGTC CTCGCAGCGA TCGCCGATGC
551 ACTGAAAATG TTGAACGAAA TCGGGTGTGT AGAGCGAAGC AGCCATGTCG
601 CCATCCGGTA GTGAGAGAGG ACGTTTTAAA AGCAATAAGC ATGCCGGATA
651 GGGGAGAAGG CGCAAACCCG AGATACCGGA ATGCCTGGGA GGGGGTCAGA
701 AGAATAATAT GCGTTGGGGA GATTACATTT CTGCACGAAA GGGGTCGCCT
751 CTATCTGATG TCAACCTAAC GGGCTGCTGT GCAGCGTTTA ATCGAAGGAA
801 TACATCATGG GCTTGTCCAT TCATACCAAC TTTGCCTCTC TGACCACCCA
851 GAACCAGCTG AACAACACCA ACAAGATGCT GGGCACCGCC ATGCAGCGCC
901 TGGGTACCGG TCTGCGCATC AACTCCGCCG CCGATGACGC CGCTGGTCTG
951 CAGATGGCCA CCCGTCTGCA GGCCCAGTCC AACGGCCAGA AGGTCGGCAT
1001 GCGCAACGCC CAGGATGCCA TCTCCATGAT GCAGACCGCC GAAGGCGCCA
1051 TGGACCAGAT GACCAACATC GTTCAGCGCA TGAAGGACCT GGCCACCCAG
1101 GGTGCGAACG GCACTACCAG CGCCGATGAC TATACCGCCC TAAATGCCGA
1151 GTTCGGCGAA CTGACCAAGG AGCTGGGTAA TATTGTTAAC AACACCAGCT
1201 TTGGTGGCCA GAAGCTGTTG AAGGGTGGTT CGTTTGAGGT CGCCACTGGT
1251 GTGACTTTCC AGATTGGTGG CTCTAGCACT GAAACATTGA AGGTTGATGT

```

1301 TACTACCGCG ATGAAGGACC TTACTGGCAC TACAGCAACT AACGGTATTG
 1351 CGGACGGTAT CGGTGATCAG ACCAAAGCCA ATGCCGCCAT CACCGAGATG
 1401 GAAACCTTCC TGAAAGACAT CGGCAGCGCC CGTTCCTCCT TCGGTGCCAA
 1451 CATCAACCGT CTGGAGCACA CCGTCAACAA CCTCTCCAAC ATGAAAGAGA
 1501 ACACCGACAT GGCGAACGGT CGCATCATGG ATGCCGACTT CGCTCAGGAG
 1551 AGCACCAACA TGACCAAGAA CCAGATGTTG ATGCAGGCTG GCATGTCCGT
 1601 GGTGTCCAAC TCCAACCAGA TGACCGGCAT GGTGACCTCC CTGCTGCGTT
 1651 **GAT**GCTGGTG GCACCCATAT CCCCGGTGGG TGCCTTTTTTC CTGTTTCTCC
 1701 TCCCGCGCCC TCTTATTCAT CGTATTTGTC AGCCGCAGCT CAAGTCTTGC
 1751 CTCGCACCTG TCGCTTCTTT CCTTCGTACG GTTATCCGCT GCGGTAGCAG
 1801 CCTCCTTCGA GGAATAGATC ATGGGTTTGT CCATTCATAC CAACTTCGCT
 1851 TCTCTGACCA CTCAGAACCA GCTGAACAAC ACCAACAAGA TGTGGGCAC
 1901 CGCCATGCAG CGCCTGGGTA CCGGTCTGCG CATCAACTCC GCCGCCGATG
 1951 ACGCCGCCGG TCTGCAGATG GCCACCCGTC TGCAAGCCCA GTCCAACGGC
 2001 CAGAAAGTTCG GCATGCGCAA CGCCAGGAT GCCATCTCCA TGATGCAAAC
 2051 CGCCGAAGGT GCCCTGGACG AAATGACCAA CATCGTTCAG CGCATGAAGG
 2101 ATCTGGCCAC CCAGGGTGCC AACGGCACTA CCAGCGCCGA AAATATCCC
 2151 GCCCTGAGCG CCGATTTCGG CGAACTGTCT ACCGAGCTGG GTAATATTGT
 2201 TAACAACACC AGCTTTGGTG GCCAAACACT GTTGAAGGGT GGTTCGTTTG
 2251 AAGTCCCCAC TGGTGTGACT TTCCAGATTG GTGGCTCTAG CACTGAAACA
 2301 TTGAAGGTTG ATGTACCTAC CGCGATGAAG GACCTTACTG GCACTACAGC
 2351 AACTAGCGGT ACTGCGGACG CTGATATTGT CGCGGGTATT GGTGATCAAA
 2401 CCAAAGCCAG TGACGCGATT ACCGCCACAA GCAACCTGCT TGATCAAATT
 2451 GGTGCTGTTC GTTCTTCCTT CGGTGCCAAC ATCAACCGTC TGGAGCACAC
 2501 CGTCAACAAC CTCTCCAACA TGAAAGAGAA CACCGACATG GCGAACGGCC
 2551 GCATCATGGA TGCCGACTTC GCCCAGGAGA GCACCAACAT GACCAAGAAC
 2601 CAGATGCTGA TGCAGGCTGG CATGTCCGTG CTGTCCAACCT CCAACCAGAT
 2651 GACCGGCATG GTGACCTCCC TGCTGCGTT**G** **ATGGTTTGCC** GGGCCGCCCC
 2701 GAGAGGGGCG GGTCTTGTTT GACAACCGCT TGCCGGTTGG AAAGGGCCGA
 2751 GCCGGTCTTT TCCAACAGGC ATGCCACCGA ATAAGGGGAT AAAGATGCAA

```

2801  ATAGATCCGG CCAGCACGGC GATGCAACTG GTGGCCGTCG AGCGCCAGAA
2851  CATGGACAAG CTGCTGAAGA AGCAGCTGGA CAGCGTCAAG GCGCAGCAGA
2901  GCGCCATCAG CAGCCTCACC ACCAAGCTGT CGAGTTTCCA GACCCTGCTC
2951  AAGGATCTGA ACAAGGCGAG CAGCCTGCAG GCTCAGAAGG CCACCCTGTC
3001  CCAGGAAGGG CTCATGACGG TGACGAGCAA TGGCAAGGCC AGCTCGGGTC
3051  AGTACAGTTT TTTCGTGGAG CAGCTTGCCC AGTCCCATCA GGTCTGGCTTG
3101  CAGCTTGACA GAGACACGGC ACCGCTGCCG GCAGACGGCG TCTTCTCCCT
3151  GACGGTCAAG GGCAAGACCC TGGACATCGA CCTGGCCTCC CTCCCGGCTC
3201  GCGCCACCGT CAAGGATCTG GTCTCCCAGA TCAACAATGC CAAGGACAAC
3251  CCGGGTGTGA AGGCGACCTT GGAACGCACC GACGGCAAGG TCAGCATGGT
3301  ACTGACCAGC AAGGAGAGCG GCGTGGAGAA CGCCATCACC CTGGGGTACA
3351  GGGGGGATGG CGCCAATGCC CTCGGGGTGG CGATGGCCGG CAAGACGGAC
3401  ATCACCAGG CGCAGGACGC CAAGCTGCGC ATGGGGGGGG ACAGCCCTCT
3451  CACCATCACT TCTGCCAGCA ACAAGATAGA GAACGTGGTG GATGGCCTGA
3501  CGTTCCAGCT GACCAAGGCG CAAAAGGCGG ATGACGCTCC GCTGCTGGTC
3551  ACGGTGGATC AGGACAAGGA GGCGGTACC GGCTCCCTCA AGAAGTTTGT
3601  CGACAGTTAC AACGAGCTGG TGGATGAGCT GGCCAAGATG ACCTCCAGCG
3651  ATCCCAAGGC GCCGGGAGCC CTCTCCTCCG ACAGCGGGGT ACGCAGCCTC
3701  AAGAGCGTGA TTGCCCAGC CGTGCGGGAG TTGCCCAGATG ATAAGACTCT
3751  GGGGAGCCTG GGGATCAAGA CCGACAAGGC GGGCAAGCTC TCCTTCAACG
3801  AGACCGACTT CAACAAGGCG CTGGAGAAGG ATCC

```

Figura 3.B.22 Secuencia nucleotídica contenida en el plásmido pARL1. Los codones de inicio así como los codones de parada de las cinco pautas de lectura abierta establecidas se han marcado subrayando y en negrita respectivamente.

En la tabla 3.B.2 resumimos las principales características de cada una de las ORFs así como su localización en la secuencia nucleotídica de la figura 3.B.22.

| ORF | Posición | %G+C | Proteína codificada | | pI ^a | GRAVY ^b |
|-------|------------|------|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | aa | KDa ^a | | |
| ORF-1 | c1-596i | - | 199 | - | - | - |
| ORF-2 | 807-1652 | 56,6 | 281 | 29,753 | 5,10 | -0,346 |
| ORF-3 | 1821-2681 | 55,7 | 286 | 29,980 | 4,74 | -0,277 |
| ORF-4 | 2771-3834i | - | 355 | - | - | - |

Tabla 3.B.2 Principales características de las 4 ORF localizadas en la secuencia nucleotídica y su ubicación en la misma.

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de Expasy

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle, (1982).

c: Secuencia complementaria.

i: ORF incompleta.

3.B.1.3.1.9 Análisis de las diferentes ORFs

ORF1

La ORF1, cuya secuencia nucleotídica está incompleta, se transcribe en dirección opuesta al resto de las ORFs de la secuencia y codifica para una proteína que mostró su mayor homología con FliU de *Salmonella choleraesuis* (Ho and Chang, 2000), con un porcentaje de similaridad del 59% y de identidad del 41%, catalogada como proteína flagelar y FliB de *Salmonella typhimurium* (Burnens y col., 1997), con un 58% de similaridad y un 41% de identidad.

En ambos casos se trata de proteínas con función de lisina-N-metilasa.

Tal como indicamos previamente, se denominó FliU a la ORF1.

```
MAASLYTPHFVQHFQCIGDRCEDNCCHSWTISIDKQTFRSYERHPDPTVKSLSKLHI IKV
KQSNERWGEIKLDEQACPFILDENRLCQIHSKAGPDALSHTCKTYPRAQTRIGNQLKRSL
MLSCPQVCRQLLLDPLAMQTEVTELTQPLPFVPPPSNAMATLHSLSIHVLAATDIPVAIR
LWLVGMLIHRVPGTELEST
```

Figura 3.B.23 Secuencia traducida en aminoácidos de FliU de *A. caviae* (incompleta).

ORF2

La ORF2 codifica para una proteína de 281 aminoácidos, localizada a continuación de FliU pero transcrita en dirección opuesta y a gran distancia de la misma, ya que 211 nucleótidos las separan. De nuevo, como la flagelina lateral de *A. hydrophila*, la ORF1 muestra su mayor homología con LafA de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter

and Wright, 1993), con un porcentaje de similaridad del 75% y de identidad del 63%; así como con otras flagelinas, entre ellas las flagelinas de *Bacillus thuringiensis* (Lovgren y col., 1993) o *Pseudomonas putida* (Senapin y col., 1998). Entre la ORF2 y la proteína LafA de *A. hydrophila* AH-3 existen porcentajes de identidad y similaridad de 78% y 72% respectivamente.

Por la secuencia amino terminal obtenida a partir de la flagelina lateral purificada de *A. caviae* Sch3N, confirmamos que se trata de la secuencia nucleotídica de la misma. (Ver Figura 3.B.3).

También como en el caso de LafA de *A. hydrophila* encontramos en el programa pFAM del Sanger Center los dos dominios conservados que caracterizan a la familia de las flagelinas, el dominio N-terminal (aminoácidos 29 a 174) y el dominio C-terminal (aminoácidos 188 a 259).

Tal como indicamos previamente, se denominó LafA1 a la ORF2.

MGLSIHTNFASLTTQNQLNNTNKMLGTAMQRLGTGLRINSAADDAAGLQMATRLQAQSNQ
QKVGMRNAQDAISMMQTAEGAMDQMTNIVQRMKDLATQGANGTTSADDYTALNAEFGELT
 KELGNIVNNTSFGGQKLLKGGSFVATGVTFQIGGSSTETLKVDVTTAMKDLTGTTATNG
 IADGIGDQTKANAAITEMETFLKDIGSARSSFGANINRLEHTVNNLSNMKENTDMANGRI
 MDADFAQESTNMTKNQMLMQAGMSVVSNSNQMTGVMVTSLLR

Figura 3.B.24 Secuencia traducida en aminoácidos de LafA1 de *A. caviae*. Los aminoácidos subrayados se corresponden con la secuencia N-terminal obtenida a partir de la proteína purificada.

ORF2'

Tal y como ocurre en la secuencia de *A. hydrophila*, la secuencia nucleotídica de la ORF2 muestra una ORF parcial transcrita en dirección opuesta cuya secuencia en aminoácidos es similar a una flagelina de *Pseudomonas aeruginosa*, FliC, (Totten y Lory, 1990). En la mencionada secuencia, sin embargo, no se localizan ni el codón de inicio ni el de parada, así como tampoco ninguna secuencia Shine-Dalgarno.

ORF3

La ORF3 codifica para una proteína de 286 aminoácidos, localizada en los 168 nucleótidos posteriores a LafA1 y transcrita en la misma dirección. Muestra homología con las mismas flagelinas que LafA de *A. hydrophila* AH-3, con porcentajes de similaridad e identidad con LafA de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993) del 67% y 57% respectivamente. En cuanto a su homología con la propia LafA de *A. hydrophila* AH-3 la similaridad e identidad son del 75% y 69% respectivamente, y con LafA1 (ORF2) muestra un 85% de similaridad y un 82% de identidad, con los primeros 20 aminoácidos exactamente idénticos, los cuales se habían obtenido previamente a partir de flagelina

lateral purificada de *A. caviae* Sch3N. Esta secuencia N-terminal es sin embargo diferente a la obtenida de las flagelinas polares de la misma cepa, FlaA1 y FlaA2 (Rabaan y col., 2001).

Los dominios conservados y hallados en el programa pFAM del Sanger Center, se encuentran entre los aminoácidos 29 y 174 del dominio N-terminal y del 193 al 264 del dominio C-terminal.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafA2 a la ORF3.

MGLSIHTNFASLTTQNQLNNTNKMLGTAMQRLGTGLRINSAADDAAGLQMATRLQAQSNQ
 QKVGMRNAQDAISM MQTAEGALDEMTNIVQRMKDLATQGANGTTSAENYPALSADFGELS
 TELGNIVNNTSFGGQTLLKGSFEVPTGVTFQIGGSSTETLKVDVPTAMKDLTGTTATSG
 TADADIVAGIGDQTKASDAITATSNLLDQIGAVRSSFGANINRLEHTVNNLSNMKENTDM
 ANGRIMDADFAQESTNMTKNQMLMQAGMSVLSNSNQMTGMVTSLLR

Figura 3.B.25 Secuencia traducida en aminoácidos de LafA2 de *A. caviae*. Los aminoácidos subrayados se corresponden con la secuencia N-terminal obtenida a partir de la proteína purificada.

ORF3'

También en la secuencia nucleotídica de la flagelina LafA2 de *A. caviae* se haya transcrita en dirección opuesta la secuencia fantasma de una ORF parcial en la que no se encuentran codones de parada o inicio, ni tampoco secuencias Shine-Dalgarno, pero que muestra similitud a la flagelina de *Pseudomonas aeruginosa*, FliC, (Totten y Lory, 1990).

ORF4

Tras 89 nucleótidos del codón de parada de la segunda flagelina lateral encontramos el ATG de inicio de la ORF4, transcrita en la misma dirección que la anterior y aunque no contamos con la secuencia completa, su producto de traducción muestra como en el caso de *A. hydrophila* AH-3 una alta homología con LafB de *Vibrio parahaemolyticus* (McCarter and Wright, 1993), con un porcentaje de similitud del 55% y de identidad del 35% y con otras proteínas que desempeñan también la función de “capuchón” del filamento, en *Pseudomonas aeruginosa* (Arora y col., 1998, 2000) o *Escherichia coli* (Kawagishi y col., 1992) respectivamente entre otras, las cuales generalmente reciben el nombre de FliD.

Tal como indicamos previamente, se denominó LafB a la ORF4.

MPPNKGIKMQIDPASTAMQLVAVERQNMDKLLKKQLDSVKAQQSAISSLTTLSSFQTLL
 KDLNKASSLQAQKATLSQEGMTVTSNGKASSGQYSFFVEQLAQSHQVGLQLDRDTAPLP
 ADGVFSLTVKGKTLDDIDLASLPAGATVKDLVSQINNAKDNPGVKATLERTDGKVSMLTS
 KESGVENAITLGYRGDGANALGVAMAGKTDITQAQDAKLRMGGDSPLTITSASNKIENVV
 DGLTFQLTKAQKADDAPLLVTVDQDKEAVTGSLKKFVDSYNELVDELAKMTSSDPKAPGA
 LSSDSGVRSLKSVIARSVREL PDDKTLGSLGIKTDKAGKLSFNETDFNKALEKDP

Figura 3.B.26 Secuencia traducida en aminoácidos de LafB de *A. caviae* (incompleta).

3.B.1.3.2 Obtención de mutantes en el locus *laf* de *A. caviae* Sch3N

Procedimos a la generación de mutantes en Sch3N mediante la inserción del determinante de resistencia a kanamicina de 2 kb derivado de pUC4-KIXX, del mismo modo que en el caso del mutante en *lafA1* AAR58, en cada uno de los genes a mutar. El procedimiento se describe en Material y Métodos, y los lugares de inserción en cada caso fueron los siguientes: *HincII* para generar el mutante AAR5 en *lafA2*, *PvuII* en el caso de los mutantes AAR9 en *lafB* y AAR20 en *fliU*. Mediante conjugación entre la cepa salvaje y el gen truncado y colocado en el vector pKNG101 se provocó una sustitución de la copia salvaje de cada uno de los genes de *A. caviae* Sch3N por la copia con el determinante de resistencia a kanamicina inserido.

En el caso del doble mutante AAR6, además del determinante de resistencia a kanamicina insertado en *lafA2* (mutante AAR5), se procedió a una doble inserción, en este caso de un determinante de resistencia a cloranfenicol de 3,7 kb, que se colocó en la diana *PvuII* de *lafA1*.

3.B.1.4 Caracterización de los mutantes del locus *laf* de *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N

Con el fin de determinar el papel desempeñado por los genes identificados en los loci *laf* de *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N en la movilidad, la biosíntesis de la flagelina lateral y la adhesión, caracterizamos los mutantes obtenidos para ambas cepas, mediante inserción de mini-Tn5 al azar o bien por inserción de determinantes de resistencia a antibióticos de forma definida, bajo diferentes análisis fenotípicos.

3.B.1.4.1 Examen de la movilidad en los diferentes mutantes

Se examinó el halo generado por la migración de la bacteria en placas de movilidad para los 3 mutantes de *A. hydrophila* AH-3, AH-1982, AH-1983y AH-1984 así como para los 5 mutantes de *A. caviae* Sch3N, AAR5, AAR6, AAR9, AAR20 y AAR58, paralelamente se observó la movilidad en medio líquido mediante el test de la gota pendiente en un microscopio óptico. Los tres mutantes de *A. hydrophila*, en *lafB* (AH-1982), *lafS* (AH-1983) y *lafT* (AH-1984) no mostraban movimiento alguno ni en las placas ni en el medio líquido, mientras que todos los mutantes de *A. caviae* se movían normalmente en el test de la gota pendiente, no siendo así en placa, donde los únicos que presentaban halos de movilidad del nivel de la cepa parental eran *lafA1* (AAR58), *lafA2* (AAR5) y *fliU* (AAR20). El doble mutante *lafA1lafA2* (AAR6) así como el mutante en *lafB* (AAR9) mostraban una reducción del 50% del halo generado en las placas de agar

semisólido. Los análisis se hicieron por triplicado en todos los casos y junto a las cepas salvajes de cada uno de los mutantes.

| Cepa | Movilidad en agar semisólido | Movilidad en medio líquido |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| <i>A. caviae</i> Sch3N | ++++ | ++++ |
| AAR58 (<i>lafA1</i>) | ++++ | ++++ |
| AAR5 (<i>lafA2</i>) | ++++ | ++++ |
| AAR6 (<i>lafA1lafA2</i>) | ++ | ++++ |
| AAR9 (<i>lafB</i>) | ++ | ++++ |
| AAR20 (<i>fliU</i>) | ++++ | ++++ |
| <i>A. hydrophila</i> AH-3 | ++++ | ++++ |
| AH-1982 (<i>lafB</i>) | - | - |
| AH-1983 (<i>lafS</i>) | - | - |
| AH-1984 (<i>lafT</i>) | - | - |

Tabla 3.B.3 Movilidad de cada uno de los mutantes y las cepas salvajes. El diámetro aproximado del halo en placa : -, 0-1 cm; ++, 2-3 cm; +++, >6 cm

3.B.1.4.2 Observación de los mutantes mediante microscopía electrónica

Para confirmar que las alteraciones en la movilidad observadas eran debidas a la pérdida del flagelo lateral en los mutantes, se prepararon muestras para la observación en un microscopio electrónico de transmisión de cada uno de ellos obtenidos a partir de crecimientos en placas semisólidas (observación del flagelo lateral) así como a partir de cultivos líquidos (observación del flagelo polar únicamente). Se prepararon también muestras de las dos cepas salvajes, *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N, que en ambos casos muestran tanto flagelación polar, en ambos tipos de medio, como lateral cuando provienen de crecimientos en placa (Figura 3.B.1)

Todos los mutantes producían flagelo polar, mientras que el flagelo lateral sólo se pudo observar en los mutantes de *A. caviae* Sch3N AAR58 (*lafA1*), AAR5 (*lafA2*) y AAR20 (*fliU*) así como en el mutante AH-1984 (*lafT*) de *A. hydrophila* AH-3.

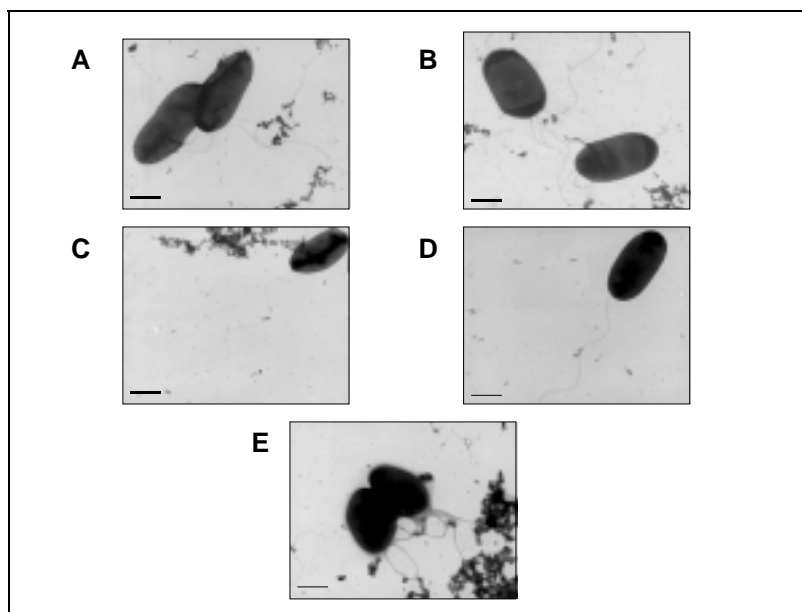


Figura 3.B.27 Microscopía electrónica de transmisión de los mutantes de *A. caviae*: AAR58 (*lafA1*) (A), AAR5 (*lafA2*) (B), AAR6 (*lafA1lafA2*) (C), AAR9 (*lafB*) (D), AAR20 (*fliU*) (E). Barra = 0,6 μ m

3.B.1.4.3 Inmunoblot en los mutantes

Como segunda prueba confirmatoria de que la pérdida de la flagelación lateral era la responsable de las alteraciones en la movilidad de los mutantes, se procedió a la realización de un Western blot a partir de preparaciones de células totales, para determinar la expresión de las flagelinas tanto polares como laterales. A partir de crecimientos en placa de las dos cepas salvajes *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N, y con el uso de una mezcla de anticuerpos policlonales específicos de cada una de las flagelinas, polar y lateral respectivamente, se determinó, mediante el protocolo descrito en Material y Métodos, la existencia de ambas flagelinas en las dos cepas a estudio y en las condiciones dadas. Paralelamente se prepararon muestras a partir de cultivo líquido de ambas cepas salvajes, en las que únicamente se detectó la flagelina polar. Estos resultados demostraron que *Aeromonas* expresa constitutivamente su flagelo polar en condiciones de laboratorio.

Ambas flagelinas también fueron detectadas en los mutantes *lafA1* (AAR58), *lafA2* (AAR5), *fliU* (AAR20) y *lafT* (AH-1984). De estos resultados se dedujo que la cepa salvaje de *A. caviae* Sch3N expresaba ambas flagelinas laterales *lafA1* y *lafA2*, siendo por los tanto las dos funcionales. Los mutantes *lafB* AAR9 y *lafA1lafA2* (AAR6) presentaban las flagelinas polares pero no las laterales, confirmando los resultados extraídos de la microscopía electrónica. En los mutantes de *A. hydrophila* *lafB* (AH-1992) y *lafS* (AH-1993) también se expresaban únicamente las flagelinas polares.

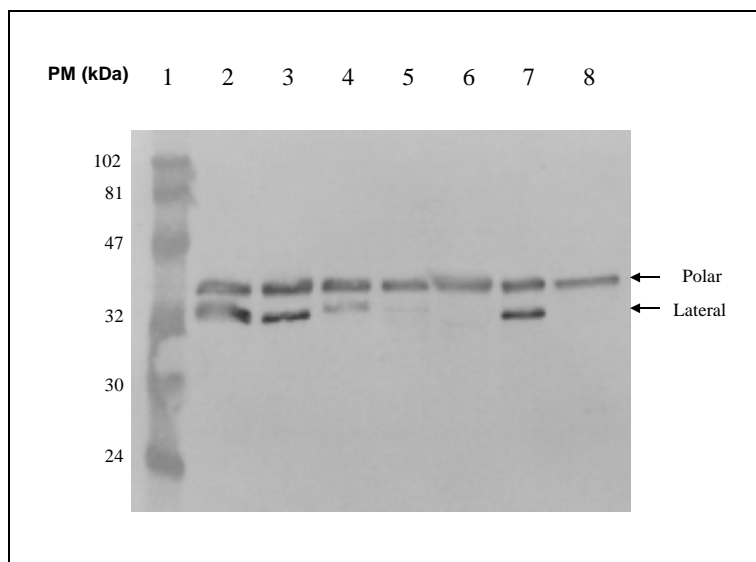


Figura 3.B.28 Inmunoblot de *A. caviae* Sch3N y sus mutantes. 1, marcador de peso molecular; 2, Sch3N salvaje procedente de medio sólido; 3, AAR58 (*lafA1*); 4, AAR5 (*lafA2*); 5, AAR6 (*lafA1lafA2*); 6, AAR9 (*lafB*); 7, AAR20 (*fliU*) y 8, Sch3N salvaje procedente de medio líquido.

3.B.1.4.3.1 Inmunoblot en mutantes del flagelo polar de *A. caviae* Sch3N

Estudios previos en *Vibrio parahaemolyticus* demuestran que las mutaciones que afectan al flagelo polar de la cepa, provocan la expresión constitutiva de la flagelación lateral (McCarter y col., 1988). A modo de determinar si ocurría lo mismo en *A. caviae* Sch3N, se emplearon mutantes definidos en el sistema de flagelación polar de la misma cepa, de los cuales AAR269 (flagelina *flaA*), AAR27 (flagelina *flaB*) y AAR 150 (*flaG*) expresaban la flagelina polar en cultivos líquidos, de modo contrario a los mutantes AAR31 (*flaAflaB*), AAR59 (HAP2 *flaH*) y AAR8 (putativa chaperona *flaJ*) (Rabaan y col., 2001). Todos ellos se hicieron crecer en medio líquido para realizar inmunoblot con la misma mezcla de anticuerpos utilizada anteriormente, anti-flagelina polar y lateral respectivamente. Ninguno de ellos mostró expresión de la flagelina lateral. Paralelamente se repitió el experimento partiendo de crecimientos en agar de cada uno de los mutantes, y en este caso, se detectaron ambas flagelinas, polar y lateral, en los mutantes AAR269 (*flaA*), AAR27 (*flaB*) y AAR159 (*flaG*); en el resto de mutantes no se detectaron ni flagelinas polares ni laterales.

De los resultados se dedujo que los sistemas flagelares de *Aeromonas* se coordinan de forma diferente a *V. parahaemolyticus*, ya que las mutaciones que provocaban la pérdida del flagelo polar, también eliminaban la formación del flagelo lateral y no causaban su expresión constitutiva.

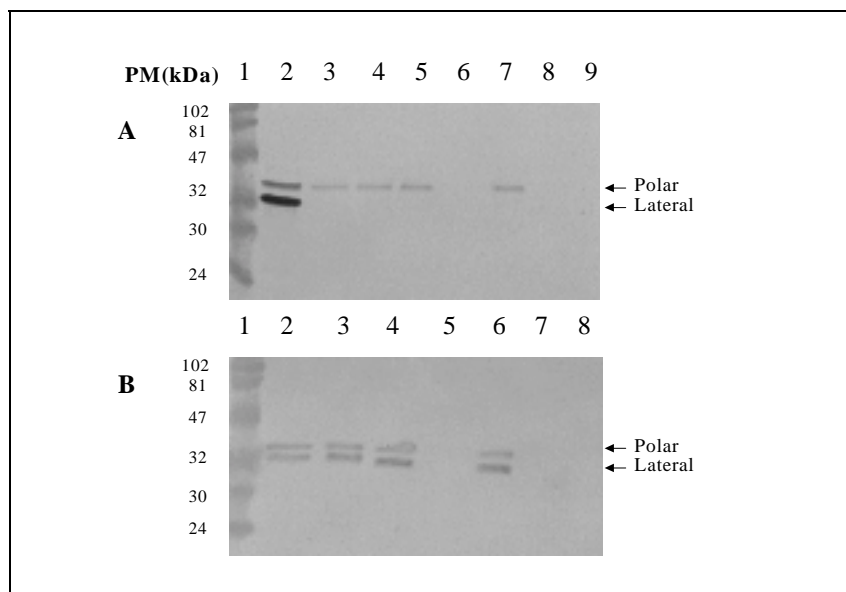


Figura 3.B.29 Inmunoblot de *A. caviae* Sch3N y sus mutantes de flagelo polar.

A. A partir de medio líquido. 1, Marcador de peso molecular; 2, Sch3N (medio sólido), 3, Sch3N (medio líquido); 4, AAR269 (*flaA*); 5, AAR27 (*flaB*); 6, AAR31 (*flaAflaB*); 7, AAR150 (*flaG*); 8, AAR59 (*flaH*); 9, AAR8 (*flaJ*).

B. A partir de medio sólido. 1, Marcador de peso molecular; 2, Sch3N; 3, AAR269 (*flaA*); 4, AAR27 (*flaB*); 5, AAR31 (*flaAflaB*); 6, AAR150 (*flaG*); 7, AAR59 (*flaH*); 8, AAR8 (*flaJ*).

3.B.1.4.4 El papel del flagelo lateral en la adhesión a células HEp-2

Conociendo la importancia del flagelo polar de *Aeromonas* en el proceso de adhesión a células epiteliales humanas HEp-2, los mutantes generados de *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N, que presentaban un flagelo polar análogo al de la cepa salvaje (aunque en algunos de los mutantes se encontrase paralizado) al mismo tiempo que carecían del flagelo lateral completa o parcialmente, nos fueron de gran utilidad para estudiar la implicación del flagelo lateral en la adhesión.

Tras realizar los ensayos de adhesión tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, los resultados nos revelaron que la propia cepa salvaje *A. caviae* Sch3N mostraba un aumento en el valor de adhesión cuando se hacía crecer en medio sólido, siendo éste de 39 bacterias por célula HEp-2. Cada uno de los mutantes simples en *lafA1* (AAR58), *lafA2* (AAR5) y *fliU* (AAR20) mostraron aproximadamente la mitad de la adhesión de la cepa salvaje, siendo de 20, 21 y 19 bacterias por célula HEp-2 respectivamente, mientras que el mutante en *lafB* (AAR9) presentaría mayor pérdida de la adhesión mostrando únicamente un 16% respecto a la cepa parental. En el caso del doble mutante *lafA1lafA2* (AAR6) encontramos la mayor pérdida de la capacidad de adherirse a células HEp-2, representando un 14% de adhesión frente a Sch3N. Los

mutantes de *A. hydrophila* AH-3 en *lafB* (AH-1982) y *lafS* (AH-1983) mostraron un 85% y 84% respectivamente de reducción en la adhesión, con sólo 3 bacterias por célula adheridas, mientras que para el mutante AH-1984 en *lafT*, la reducción fue del 51%.

En todos los casos, el ensayo de adhesión se llevó a cabo por duplicado, en momentos diferentes, y se calculó el valor medio obtenido \pm la desviación estándar. El resultado obtenido en los mutantes era estadísticamente significativo comparado con las cepas salvajes correspondientes ($P \leq 0,0005$).

| Cepa | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 \pm SD |
|----------------------------|---|
| <i>A. caviae</i> Sch3N | 39,1 \pm 4'8 |
| AAR58 (<i>lafA1</i>) | 20,25 \pm 3,9 (51) |
| AAR5 (<i>lafA2</i>) | 20,8 \pm 3,1 (52) |
| AAR6 (<i>lafA1lafA2</i>) | 5,55 \pm 2,7 (14) |
| AAR9 (<i>lafB</i>) | 6,3 \pm 1,7 (16) |
| AAR20 (<i>fliU</i>) | 18,6 \pm 4,49 (47) |
| <i>A. hydrophila</i> AH-3 | 18,3 \pm 2,2 |
| AH-1982 (<i>lafB</i>) | 2,76 \pm 0,8 (85) |
| AH-1983 (<i>lafS</i>) | 2,85 \pm 0,7 (84) |
| AH-1984 (<i>lafT</i>) | 9,22 \pm 1,3 (49) |

Tabla 3.B.4 Ensayos de adhesión sobre células HEp-2. Los valores entre paréntesis son porcentajes respecto al control.

3.B.1.4.5 El papel del flagelo lateral en la formación de biofilms *in vitro*

Se ensayó la capacidad de los mutantes para la formación de biofilms *in vitro* tal y como se describe en Material y Métodos, encontrando descensos del 64%, 62% y 37% respectivamente en cada uno de los mutantes de *A. hydrophila* AH-3 AH-1982 (*lafB*), AH-1983 (*lafS*) y AH-1984 (*lafT*). La pérdida de capacidad en la formación de biofilms fue de un 32% o un 35% en los mutantes de *A. caviae* Sch3N AAR6 (*lafA1lafA2*) y AAR9 (*lafB*) respectivamente, mientras que en los mutantes AAR58 (*lafA1*) y AAR5 (*lafA2*) no se observó desviación alguna de los resultados frente al control.

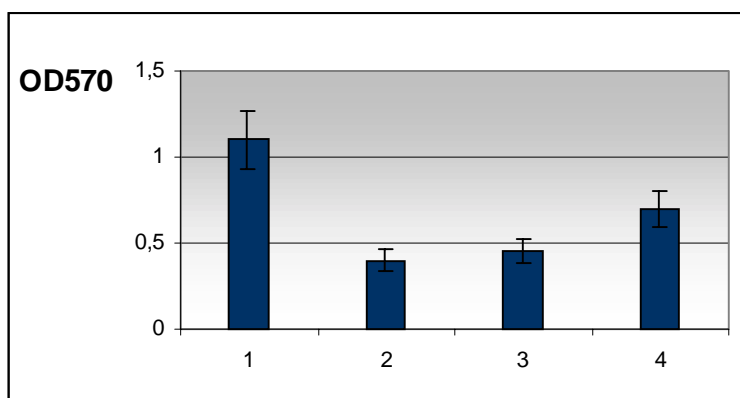


Figura 3.B.30 Habilidad para la formación de biofilms *in vitro* de *A. hydrophila* AH-3 y sus mutantes. 1, AH-3 salvaje; 2, AH-1982 (*lafB*); 3, AH-1983 (*lafS*); 4, AH-1984 (*lafT*). La barra vertical representa la desviación estándar.

3.B.1.4.6 Estudio de moléculas de superficie implicadas en adhesión *in vitro*

Algunas moléculas presentes en la superficie celular de *Aeromonas*, como proteínas de membrana externa, OMP del inglés “outer membrane protein”, o bien el lipopolisacárido (LPS), están asociadas a la capacidad de adhesión de la cepa *in vitro*, lo cual nos llevó a realizar el análisis de los perfiles tanto de las OMP como del LPS de cada uno de los mutantes. En ningún caso encontramos diferencias frente a las cepas salvajes, *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N. (No se muestran los resultados).

3.B.1.5 Análisis de complementación de los mutantes

3.B.1.5.1 Construcción del plásmido pACYC-MOT

El hecho de que los tres mutantes de *A. hydrophila* AH-3 mostrasen la flagelación polar como la cepa parental y sin embargo fuesen incapaces de nadar, sugería que todos ellos pudiesen afectar por polaridad, debida a la inserción del mini-Tn5, al par de genes *lafT* y *lafU*, que constituyen el motor del flagelo lateral, y por los resultados también el motor del flagelo polar. Para responder a la duda, se construyó el plásmido pACYC-MOT, que contenía ambos genes *lafT* y *lafU* procedentes de *A. hydrophila* AH-3. Para ello se amplificó un fragmento de 2112 pb en el genoma de *A. hydrophila* AH-3 mediante la PCR llevada a cabo con los cebadores LAFS7-LAFU5, a una T^a de hibridación ADN/cebador de 56°C y con un tiempo de extensión de 2 minutos 10 segundos. La banda generada se ligó al vector pACYC184 y se mantuvo en la cepa de *E. coli* DH5 α .

3.B.1.5.2 Complementación con el plásmido pACYC-MOT

Se transformaron mediante conjugación triparental cada uno de los tres mutantes de *A. hydrophila* AH-3, AH-1982, AH-1983 y AH-1984, con la cepa de *E. coli* portadora

del plásmido pACYC-MOT. Se seleccionaron aquellos conjugantes capaces de crecer en placas de TSA suplementadas con rifampicina, tetraciclina y kanamicina, de los que se eligió uno de los transconjugantes generados para cada mutante. Además de asegurar que todos ellos fuesen oxidasa positivos, se obtuvo plásmido de cada uno de los 3 seleccionados para corroborar mediante patrones de restricción con diferentes enzimas, que los plásmidos extraídos de cada mutante de *Aeromonas* eran aquellos que manteníamos en *E. coli* DH5 α . Paralelamente se obtuvieron transformantes de cada uno de los mutantes con el plásmido pACYC184 carente de inserto, que nos servirían de control.

Procedimos a los ensayos fenotípicos que nos indicarían si la expresión en *trans* de los genes salvajes, obtenida a partir de los plásmidos, nos proporcionaría la recuperación del fenotipo de AH-3 para cada mutante. Se repitieron para ello los test de movilidad en líquido y en placa, así como los ensayos de adhesión, el Western blot con anticuerpos anti-flagelina lateral y los análisis para la formación de biofilms.

De todo ello resultó que los tres mutantes recuperaban la movilidad en medio líquido, aunque únicamente el mutante AH-1984 era capaz de moverse como la cepa salvaje en medio semisólido, el mismo que aumentaba sus valores de adhesión a células HEp-2 y la capacidad de formar biofilms a los niveles de la cepa salvaje. Por el contrario, los mutantes AH-1982 y AH-1983, no recuperaban la movilidad en placa y sólo mostraban un 50% de aumento de adhesión frente a la cepa parental además, los valores en los ensayos de formación de biofilm sólo mostraban una recuperación parcial, manteniendo todavía disminuciones del 53% y 34% respectivamente frente al control. Los tres mutantes complementados con el plásmido pACYC-MOT mantenían los mismos resultados en el Western blot, AH-1984 expresaba la flagelina lateral antes de la complementación y AH-1982 y AH-1983 no la producía ni antes ni después de la misma. (Ver tabla 3.B.5).

También utilizamos el plásmido pACYC-MOT para complementar los mutantes no móviles de *E. coli* RP6666 y RP6647 ambos afectados en los genes constituyentes del motor flagelar *motA* y *motB* respectivamente (Slocum and Parkinson, 1983). La movilidad de los dos mutantes se restableció por completo.

3.B.1.5.3 Complementación con el cósmido pCOS-LAF

En un nuevo intento de recuperar la funcionalidad de los mutantes, se empleó el cósmido pCOS-LAF, derivado de una genoteca de *A. hydrophila* AH-3, tal y como hemos descrito previamente, que contiene los 9 genes constituyentes del locus *laf* de la cepa salvaje. Este se traspasó igualmente mediante conjugación triparental a los tres mutantes

AH-1982, AH-1983 y AH-1984, así como a los 5 mutantes de *A. caviae* Sch3N. Se seleccionaron los transformantes en placas suplementadas con los antibióticos necesarios y se procedió a los ensayos fenotípicos, que mostraron una recuperación total en los tres mutantes de AH-3, tanto a nivel de movilidad (en medio líquido y sólido respectivamente) como de adhesión, de expresión de la flagelina lateral y/o de formación de biofilms (ver tabla 3.B.5). Lo mismo ocurrió con los mutantes AAR6 (*lafA1/lafA2*) y AAR9 (*lafB*) de *A. caviae*. Al igual que en la complementación anterior, se obtuvieron transformantes de cada uno de los mutantes, en este caso con el cósmido pLA2917 para emplearlos como control.

| Cepa | Detección de flagelina lateral (Western blot) | Movilidad (agar) | Movilidad (líquido) | Nº medio de bacteria/cél HEp-2 ± SD |
|---------------------------|---|------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <i>A. hydrophila</i> AH-3 | + | ++++ | ++++ | 18,3 ± 2,2 |
| AH-1982 | - | - | - | 2,76 ± 0,8 (85) |
| AH-1983 | - | - | - | 2,85 ± 0,7 (84) |
| AH-1984 | + | - | - | 9,22 ± 1,3 (49) |
| AH-1982 + pCOS-LAF | + | ++++ | ++++ | 17,9 ± 2,3 |
| AH-1983 + pCOS-LAF | + | ++++ | ++++ | 17,7 ± 2,6 |
| AH-1984 + pCOS-LAF | + | ++++ | ++++ | 18,1 ± 2,0 |
| AH-1982 + pLA2917 | - | - | - | 2,69 ± 0,5 (85) |
| AH-1983 + pLA2917 | - | - | - | 2,81 ± 0,8 (84) |
| AH-1984 + pLA2917 | + | - | - | 9,08 ± 1,5 (50) |
| AH-1982 + pACYC-MOT | - | - | - | 8,60 ± 2,3 (53) |
| AH-1983 + pACYC-MOT | - | - | - | 8,83 ± 2,1 (52) |
| AH-1984 + pACYC-MOT | + | ++++ | ++++ | 18,2 ± 2,4 |
| AH-1982 + pACYC184 | - | - | - | 2,73 ± 0,6 (85) |
| AH-1982 + pACYC184 | - | - | - | 2,88 ± 0,9 (84) |
| AH-1982 + pACYC184 | + | - | - | 9,11 ± 1,2 (50) |

Tabla 3.B.5 Resultados de los ensayos fenotípicos de los transconjugantes de *A. hydrophila*. Los valores entre paréntesis en los valores de adhesión son porcentajes respecto al control.

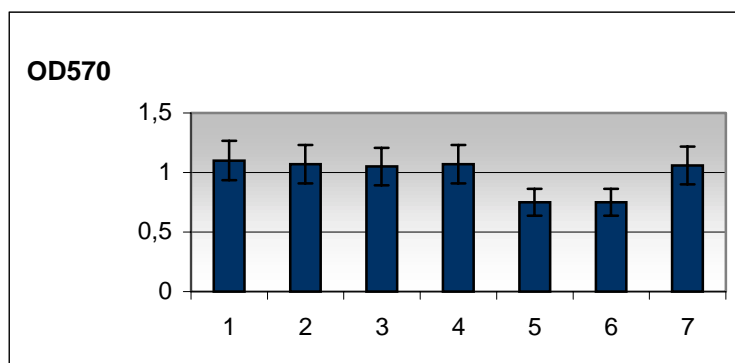


Figura 3.B.31 Habilidad para la formación de biofilms *in vitro* de *A. hydrophila* AH-3 salvaje (1), y sus mutantes AH-1982 (*lafB*), AH-1983 (*lafS*) y AH-1984 (*lafT*) complementados con el cósmido pCOS-LAF (2-4) y el plásmido pACYC-MOT (5-7) respectivamente. Las barras verticales representan la desviación estándar.

3.B.1.6 Distribución de los genes *laf* en *Aeromonas* mesófilas

3.B.1.6.1 Distribución poblacional mediante dot blot

Para estudiar la distribución de los genes *laf* entre una población de 20 cepas de *Aeromonas* mesófilas, entre las cuales estaban incluidas las especies, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *veronii* y *A. veronii* bv. *sobria*, se obtuvieron tres sondas de ADN marcadas con digoxigenina que abarcasen los genes *lafB-C*, *lafX-S* y *lafT-U*. Para ello se amplificaron dichos fragmentos de 892, 2159 y 2112 pb respectivamente mediante PCR en *A. hydrophila* AH-3, con condiciones de Tª de hibridación ADN/cebador y tiempo de extensión para la primera de 58°C-50 segundos, y para las dos segundas de 56°C-2 minutos 10 segundos. Los cebadores usados en cada caso fueron LAFBB-LAFCB, LAFC2-KISI2 y LAFS7-LAFU5 respectivamente.

Con cada una de las sondas se procedió a realizar una hibridación frente al ADN genómico de las 20 cepas de *Aeromonas* seleccionadas. En todos los casos resultaron positivas.

3.B.1.6.2 Generación de mutantes en diversas cepas de *Aeromonas*

Se seleccionaron para el experimento las cepas *A. hydrophila* O:3, *A. veronii* bv. *veronii* AS-28 y *A. veronii* bv. *sobria* AH-1, de las cuales se obtuvieron mutantes por recombinación en un punto tal y como se describe en Material y Métodos en cada uno de los genes *lafB* (cebadores LAFB2-LAFB3) y *lafT* (cebadores LAFT1-LAFT2). Para ello se amplificaron mediante PCR sendos fragmentos internos de cada uno de estos genes de

619 y 671 pb respectivamente, y a partir de *A. hydrophila* AH-3. Las condiciones de cada una de las PCR fueron 56°C y 58°C respectivamente de T^a de hibridación ADN/cebador y 45 segundos de extensión en ambas. Tras la obtención de dichas bandas amplificadas, éstas se ligaron al plásmido suicida pFS100, para generar los plásmidos pFS-LafB y pFS-LafT.

Tras analizar cada uno de los mutantes generados, se observó que los tres mutantes en *lafT*, O:3T, AS-28T y AH-1T, se comportaban de igual modo, produciendo flagelación polar y sin embargo no moviéndose ni en medio líquido ni en sólido, aun expresando el flagelo lateral como la cepa salvaje de la que provenía cada uno de ellos, además de mostrar una adhesión a células HEp-2 reducida respecto a cada una de las cepas salvajes. Por el contrario, aunque los tres mutantes en *lafB*, O:3B, AS-28B y AH-1B, también se comportaban de forma análoga entre sí, diferían de los mutantes en *lafT* por su incapacidad de producir flagelación lateral en medio sólido. También éstos mostraban reducción en los resultados de los análisis de adhesión.

Los 6 mutantes se complementaron tanto con el plásmido pACYC-MOT como con el cósmido pCOS-LAF. El primero era capaz de recuperar la movilidad y la adhesión de todos los mutantes, mientras que era incapaz de restablecer la expresión de flagelo lateral en los 3 mutantes *lafB*, y éstos sólo recuperaban parcialmente sus niveles de adhesión. El cósmido pCOS-LAF restablecía el fenotipo de la cepa salvaje en los 6 mutantes.

| Cepas | Nº medio de bacteria/cél HEP-2 \pm SD |
|--|---|
| <i>A. hydrophila</i> O:3 | 21,6 \pm 2,4 |
| <i>A. hydrophila</i> O:3B | 4,61 \pm 1,2 (81) |
| <i>A. hydrophila</i> O:3T | 10,3 \pm 1,9 (52) |
| <i>A. hydrophila</i> O:3B + pCOS-LAF | 20,8 \pm 3,2 |
| <i>A. hydrophila</i> O:3T + pCOS-LAF | 21,3 \pm 2,0 |
| <i>A. hydrophila</i> O:3B + pACYC-MOT | 10,5 \pm 1,7 (51) |
| <i>A. hydrophila</i> O:3T + pACYC-MOT | 20,8 \pm 2,5 |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> AS-28 | 31,7 \pm 4,6 |
| <i>A. veronii</i> AS-28B | 5,70 \pm 3,2 (82) |
| <i>A. veronii</i> AS-28T | 15,5 \pm 4,0 (51) |
| <i>A. veronii</i> AS-28B + pCOS-LAF | 30,2 \pm 5,1 |
| <i>A. veronii</i> AS-28T + pCOS-LAF | 31,1 \pm 3,3 |
| <i>A. veronii</i> AS-28B + pACYC-MOT | 16,1 \pm 5,2 (49) |
| <i>A. veronii</i> AS-28T + pACYC-MOT | 30,5 \pm 2,9 |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> AH-1 | 32,3 \pm 3,9 |
| <i>A. sobria</i> AH-1B | 5,17 \pm 1,8 (84) |
| <i>A. sobria</i> AH-1T | 16,3 \pm 3,5 (50) |
| <i>A. sobria</i> AH-1B + pCOS-LAF | 30,9 \pm 4,7 |
| <i>A. sobria</i> AH-1T + pCOS-LAF | 30,5 \pm 5,3 |
| <i>A. sobria</i> AH-1B + pACYC-MOT | 17,8 \pm 4,4 (45) |
| <i>A. sobria</i> AH-1 T + pACYC-MOT | 31,5 \pm 2,9 |

Tabla 3.B.6 Adhesión a células epiteliales HEP-2 de diferentes *Aeromonas* mesófilas, sus mutantes y los mismos complementados.

3.B.2 Discusión

Las *Aeromonas* mesófilas expresan un flagelo polar simple, y el hecho de que requieran dicho flagelo para colonizar células epiteliales humanas HEP-2 queda constatado en diferentes publicaciones entre las cuales se incluye la sección A de este trabajo (Gryllos y col., 2001; Rabaan y col., 2001). Además, ciertas cepas de *Aeromonas* son capaces de producir diversos flagelos laterales peritricos cuando crecen en un medio

de cultivo semisólido (Shimada y col., 1985). Esta hiperflagelación desarrollada coincide con un aumento de los niveles de adhesión de las bacterias cuando éstos se comparan con los obtenidos tras el crecimiento de las mismas en medio líquido. Esto nos llevó a investigar el papel del flagelo lateral de *Aeromonas* en la adhesión *in vitro*, con lo que identificamos y posteriormente inactivamos cuatro genes flagelares de *A. caviae* Sch3N, entre los que se encontraban los dos genes que codifican para sus dos flagelinas laterales, *lafA1* y *lafA2*, además de los genes flanqueantes, de los que la secuencia se haya incompleta, *fliU* y *lafB*. Se crearon además tres mutantes por inserción de transposón en diferentes genes de flagelo lateral de *A. hydrophila* AH-3, que posteriormente se secuenciaron, obteniendo de este modo la secuencia completa de los nueve genes que componen el locus *laf*. Todos los mutantes generados se analizaron para la adhesión a células epiteliales HEp-2, deduciendo a partir de los datos obtenidos, que ambas cepas necesitan el flagelo lateral para su óptima adhesión. Las mutaciones que causan la pérdida completa del flagelo lateral, en cada uno de los mutantes AAR6, AAR9, AH-1982 y AH-1983, provocan aproximadamente un 85% de reducción de la adhesión, mientras que los mutantes AAR58, AAR5, AAR20 y AH-1984, que no pierden el flagelo lateral, reducen únicamente a la mitad su capacidad de adhesión. Mediante microscopía electrónica e inmunoblot hemos demostrado que ninguno de los mutantes generados pierden su flagelo polar, aunque los tres mutantes de *A. hydrophila* han perdido la funcionalidad de dicho flagelo. Estos últimos además, reducen de manera importante la habilidad de la cepa salvaje *A. hydrophila* AH-3 para formar biofilms *in vitro*. Tanto la capacidad de adhesión como la de formar biofilms, son recuperadas por los mutantes cuando expresan en *trans* las copias salvajes de los genes afectados por la mutación, con lo que de nuevo se demuestra la importancia del flagelo lateral en los dos procesos analizados.

Las células hiperflageladas de *A. hydrophila* o *A. caviae* no se diferencian en células de “swarming” multinucleadas tal y como ocurre en *V. parahaemolyticus* (McCarter y Silverman, 1990). *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum*, que producen también flagelación mixta; tampoco elongan sus células (Moens y col., 1995a; Alexandre y col., 1999). Los experimentos iniciales se dirigieron hacia la determinación de si los flagelos laterales se componían de una hiperexpresión de flagelinas polares o por el contrario se debían a otro tipo de flagelinas, como ocurre en *V. parahaemolyticus*. Para ello se purificaron ambos tipos de flagelos a partir de crecimientos en medio sólido y se analizaron demostrando que las flagelinas laterales mostraban una masa molecular menor que la de las polares. Además, la secuencia N-terminal de las tres flagelinas laterales secuenciadas en este trabajo muestra diferencias frente a la secuencia amino

terminal de flagelinas polares de *Aeromonas*. Las masas moleculares de las flagelinas laterales de *A. caviae*, LafA1 y LafA2, son de 29,8 y 30,0 kDa respectivamente y la de *A. hydrophila* de 29,5 kDa, según se deduce de su secuencia nucleotídica, aunque las tres flagelinas muestran un mayor peso molecular en geles de SDS-PAGE. Una explicación para dicha discrepancia sería la presencia de grupos glicosil que muestran las flagelinas laterales, sugiriendo que dichas proteínas son sometidas a modificaciones postraduccionales. La glicosilación de flagelinas ya se ha descrito anteriormente, y cada vez es mayor el número de bacterias que la muestran, incluida la propia *A. caviae* Sch3N en sus flagelinas polares (Rabaan y col., 2001). A diferencia de *A. caviae*, *A. brasilense* únicamente posee glicosiladas sus flagelinas polares (Moens y col., 1995b). Tanto en *A. hydrophila* como en *A. caviae* esta glicosilación podría ser ejecutada por el operón *flm* descrito en la primera parte de este trabajo, como ocurre con las proteínas Flm en *Caulobacter crescentus* (Lecrerc y col., 1998; Gryllos y col., 2001).

La organización de los loci de ambas *Aeromonas* presentadas en este trabajo, muestran similitud con *V. parahaemolyticus*, sin embargo en el caso de *A. caviae* hay un factor diferencial frente a *A. hydrophila*, así como frente a *V. parahaemolyticus* y *A. brasilense*, y es el hecho de poseer un doblete de flagelinas laterales en lugar de una sola como en el resto de casos (McCarter and Wright, 1993; Moens y col., 1995a). A este respecto, *A. caviae* tendría semejanzas con otros loci de flagelinas polares de *Aeromonas* (Umelo y Trust, 1997; Rabaan y col., 2001). Las dos flagelinas laterales de *A. caviae* son muy similares tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, por lo que podrían ser el resultado de una duplicación génica. Las dos flagelinas de *A. caviae*, tanto en el locus de flagelo polar como en el de lateral parecen transcribirse de manera independiente, por la existencia tras la primera flagelina de un putativo terminador transcripcional. Un putativo promotor transcripcional σ^{54} se encuentra de forma anterior al codón de inicio de los genes de *A. caviae* *lafA1* y *lafB*, también hay un putativo promotor transcripcional en *A. hydrophila* *lafA*. Estos modelos parecen similares al encontrado en *A. brasilense*, donde dos secuencias σ^{54} preceden al gen de la flagelina lateral *flaA1* (Moens y col., 1995a). En la secuencia precedente a la segunda flagelina lateral de *A. caviae* no se ha encontrado ningún putativo promotor, ni σ^{54} ni σ^{28} , lo que sería análogo a la flagelina lateral de *V. parahaemolyticus* que requiere de un factor transcripcional sigma específico, LafS (McCarter y Wright, 1993). El locus *laf* de *A. hydrophila* contiene en la misma posición ocho de los nueve genes del locus *laf* de *V. parahaemolyticus*, siendo la única excepción el gen *lafX*, que no muestra homologías significativas en las bases de datos, aunque podría tratarse de LafD, una putativa proteína de función desconocida en *V. parahaemolyticus*. Otra ORF adicional se presenta en *A. caviae*, transcrita en dirección

opuesta a los otros tres genes y con similaridad a *fliU* o *fliB* de *Salmonella* (Doll and Frankel, 1993). Aunque no se conoce con exactitud la función de la proteína codificada por *fliU*, se sabe que es esencial para la biogénesis del flagelo (Doll and Frankel, 1993). Sin embargo, FliB está envuelta en la metilación de residuos de lisina en la flagelina de *Salmonella* (Burnens y col., 1997). La mutación de *fliU* en *A. caviae* no afecta ni a la movilidad ni a la producción de flagelina polar y/o lateral, tal y como muestran los ensayos de movilidad en agar semisólido o los análisis por Western blot, resultado similar al encontrado para mutantes en *fliB* (Burnens y col., 1997). Aun así, el mutante en *fliU* de *A. caviae* sí muestra una reducción de su capacidad de adhesión, lo que sugiere que de algún modo debe afectar al flagelo, si es que no se trata de un efecto secundario sobre otro factor de adhesión de la cepa. En la misma secuencia nucleotídica que codifica para las flagelinas laterales, tanto de *A. caviae* como de *A. hydrophila*, se encuentran vestigios de una proteína transcrita en dirección opuesta a las mismas que muestran homología con la flagelina FliC de *P. aeruginosa* (Totten y Lory, 1990). Posiblemente *fliU* de *A. caviae*, forma parte de este redundante operón flagelar encontrado, junto con las dos flagelinas residuales.

Los mutantes simples de cada una de las dos flagelinas laterales de *A. caviae* continuaban produciendo flagelo lateral y nadando como la cepa salvaje en medio líquido, mientras que el mutante doble, AAR6, carecía de flagelos laterales y presentaba movilidad reducida. Estos resultados sugieren que en la cepa de *A. caviae* estudiada no hay otras flagelinas laterales, con lo que el filamento flagelar, del mismo modo que ocurre en el caso del flagelo polar de la misma cepa, es un filamento complejo compuesto de las dos flagelinas identificadas. Los mutantes en LafB, putativa proteína que da lugar al “capuchón” del filamento, tanto en *A. hydrophila* como en *A. caviae*, carecen de flagelos laterales, lo mismo que ocurre en los flagelos bacterianos de otras cepas como *P. aeruginosa*, o en el propio flagelo polar de *A. caviae* (Arora y col., 1998; Rabaan y col., 2001). El mini-Tn5 en el gen *lafS* de *A. hydrophila* también inhibe la expresión de flagelo lateral, tal como se ha observado en el sistema de flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, sin embargo, el mutante en *lafT* de *A. hydrophila* continua expresando tanto el flagelo polar como el lateral, aunque no se mueve ni en medio líquido ni en sólido, lo que sugiere que LafT, homólogo a MotA, forma parte del motor tanto lateral como polar, y no debe existir ningún otro homólogo a MotA en el genoma de *A. hydrophila* que compense la pérdida. Esta suposición se apoya también en el hecho de que la introducción en el mutante del plásmido pACYC-MOT, recupere el fenotipo salvaje de la cepa. Así pues el sistema motor en *A. hydrophila* funcionaría del mismo modo que el motor del flagelo lateral de *V. parahaemolyticus*, aunque en esta cepa el flagelo polar posee un sistema

independiente y menos convencional, propulsado por iones sodio en lugar de protones (Atsumi y col., 1992). Este tipo de motor podría ser una adaptación al medio marino en el que vive *V. parahaemolyticus*. Así mismo, sería una redundancia que *Aeromonas* poseyera un par de motores idénticos para cada uno de sus tipos de flagelo.

En otras bacterias que poseen flagelación mixta, como *V. parahaemolyticus*, se ha demostrado que perturbaciones físicas o genéticas del flagelo polar inducen la expresión de la flagelación lateral (McCarter y col., 1988). Una observación similar se ha hecho para un mutante pleiotrópico de *Azospirillum lipoferum*, que careciendo del flagelo polar expresa de manera constitutiva la flagelación lateral (Alexandre y col., 1999). Este no parece ser el caso de *A. caviae*, ya que mutantes definidos en el sistema de flagelación polar, son incapaces de expresar también el flagelo lateral, algo que también ocurre en un mutante indefinido de flagelo polar en *A. brasilense* (Moens y col., 1996). La pérdida de ambos tipos de flagelos podría deberse al hecho de que los dos sistemas compartan alguna estructura, algo evidente con el fenotipo del mutante en *lafT* de *A. hydrophila*. A cerca de la jerarquía en la regulación del sistema flagelar de *Aeromonas* no podemos discutir nada por falta de datos, aunque sí podemos concretar que el sistema de flagelación lateral depende del sistema de flagelación polar, pero no se da la situación inversa, ya que mutaciones en genes de flagelación lateral no afectan a la expresión del flagelo polar. La movilidad del sistema polar, sin embargo, sí se ve afectada por las mutaciones por mini-Tn5 en *A. hydrophila*, lo que debe ser un efecto polar sobre los dos últimos genes del locus, *lafT* y *lafU*, genes que componen el motor flagelar y sí parecen ser esenciales para ambos sistemas.

El trabajo de Shimada y col., (1985) demostró que aproximadamente entre el 20% y el 30% de las cepas de *Aeromonas* expresaban flagelación lateral, aunque en este análisis era la expresión de los genes y no la posesión lo que se encontraba bajo estudio mediante observación directa de los flagelos, por lo que podría haber una parte de la población que contara con la maquinaria genómica pero no pudiese expresarla en las condiciones en las que se daba el estudio. Por el contrario, nuestros primeros estudios poblacionales mediante sondas de ADN mostraban que un 100% de las 20 cepas bajo análisis contendría los genes de flagelación lateral.

Habiendo ya demostrado la importancia del flagelo polar de *A. caviae* y *A. hydrophila* frente a la adhesión a células HEp-2 en la primera parte de este trabajo, así como demuestran Rabaan y col., (2001), y sabiendo que *A. caviae* creciendo sobre medio sólido aumentaba sus niveles de adhesión (Thornley y col., 1995), además de que el flagelo lateral está considerado como una adaptación a la vida sobre superficies y su expresión ha sido asociada a una mejor adhesión y colonización de las mismas (Belas y

Colwell, 1982), nos quedaba por demostrar si efectivamente el flagelo lateral poseía mayor capacidad de adhesión, razón por la que se trabajó con los mutantes transformados con el cósmido pCOS-LAF. Los resultados obtenidos mostraron que el flagelo lateral, efectivamente, no sólo está implicado en la adhesión tanto de *A. caviae* como de *A. hydrophila* a células epiteliales humanas, sino que la potencia y podría posiblemente estar envuelto en la colonización del huésped humano. Existen además antecedentes de la capacidad de invasión de *A. caviae* Sch3N (Shaw y col., 1995), y se sabe que al menos en *Proteus mirabilis*, la movilidad mediante “swarming” confiere la habilidad de invasión (Allison y col., 1992). Un biofilm es una acumulación de microorganismos envueltos en una matriz de polisacárido que ellos mismos forman y adhieren a la superficie. Las bacterias formando biofilms son más resistentes a las defensas del huésped y a los agentes antimicrobianos que si se encuentran aisladas; nuestros resultados muestran que el flagelo lateral también es importante para la formación de biofilms *in vitro*.

3.C.1 Resultados

Tras los resultados obtenidos en el estudio de la distribución de los genes involucrados en la flagelación lateral en *Aeromonas* mesófilas, decidimos profundizar en su estudio para poder obtener resultados más concretos.

3.C.1.1 Distribución de las flagelinas laterales

3.C.1.1.1 Alineamiento de flagelinas de *Aeromonas* spp.

Se alinearon las secuencias nucleotídicas que codifican para las flagelinas laterales *lafA* de *A. hydrophila* AH-3 y *lafA1*, *lafA2* de *A. caviae* Sch3N, así como las que codifican para las flagelinas polares *flaA*, *flaB* de *A. caviae* Sch3N (Rabaan y col., 2001) y *flaA*, *flaB* de *A. salmonicida* A449 (Umelo y Trust, 1997). Tras localizar en el alineamiento (Figura 3.C.1) los dos dominios conservados N-terminal y C-terminal respectivamente, se diseñaron dos cebadores 100% idénticos en las tres secuencias de flagelinas laterales, LAF1 y LAF2, que a su vez fuesen diferenciales con las flagelinas polares, de modo que pudiesen discriminarse mediante PCR.

```

LAF1C 1 ATGGGGCTGTCCATTTCATACCAACTTTCCCTCTCTGACCAACCCAGAACAGCTGAACAAC
LAF2C 1 ATGGGGTTGTCCATTTCATACCAACTTCCCTCTCTGACCACTCAGAACAGCTGAACAAC
LAFAH 1 ATGGGGCTGTCCATTTCATACCAACTTTCCCTCTCTGACCAACCCAGAACAGCTGAACCT
FLAAC 1 ATCAGTCTGTATATCAATACCAACGTTTCATCTCTCAACGCTCAGCGTAACATGATGAAC
FLABC 1 ATGGCCATGTATATCAATACCAATACCTTCATCACTGAACGCTCAGCGTAATTTGATGAAT
FLAAS 1 ATGGCACTTTATATCAATACCAACGTTTCATCTCTCAACGCCAGCGTAACCTGATGAAC
FLABS 1 ATGGCCATGTATCATCAACCAATACCTTCATCACTGAACGCCAGCGTAACCTGATGAAT

LAF1C 61 ACCAACAAGATGCTGGGCACCGCCATGCAGCGCTGGGTACCGGTCTGCGCATCAACTTC
LAF2C 61 ACCAACAAGATGCTGGGCACCGCCATGCAGCGCTGGGTACCGGTCTGCGCATCAACTTC
LAFAH 61 ACCAACAAGATGCTGGGCACCGCCATGCAGCGCTGGGTACCGGTCTGCGCATCAACTTC
FLAAC 61 AGCACCAAATCCCTGGATACCTCTACACCGCTCTGGCTCCCGCTCTGCGCATCAACAGC
FLABC 61 ACCAGCAAGTCTGCTGGATACCTCTACACTCGTCTGGCTCTGGCTCTGCGTATCAATAGC
FLAAS 61 ACCAACAATCTCTGGATACCTCTACACCGCTCTGGCATCTGGTCTGCGCATCAACAGC
FLABS 61 ACCAACAAGTCTCTGGATACCTCTATACCACTGGCTCCCGTTTGGCTATCAACACC

LAF1C 121 GCCGCCGATGACGCCGCTGGTCTGCAGATGGCCACCCGTCTGCAGGCCAGTCCAACGGC
LAF2C 121 GCCGCCGATGACGCCGCTGGTCTGCAGATGGCCACCCGTCTGCAGGCCAGTCCAACGGC
LAFAH 121 GCTGCCGACGATGCTGCCGGTCTGCAATCGCCACTCGTCTGCAGGCTCAGTCCAATGGT
FLAAC 121 GCCAAGGACGATGCCGCCGGTCTGCAGATTCCAACCGTCTGACCTCTCAGATCAACGGT
FLABC 121 GCTAAAGATGATGCCGCCGGTCTGCAGATCTCCAACCGTCTGACCTCCCAATCAACGGT
FLAAS 121 GCAAAAGACGATGCCGCCGGTCTGCAATATCCAACCGTCTGACCTCCAGATCAATGGA
FLABS 121 GCCAAGGACGATGACGCCGGTCTGCAGATCTCCAACCGTCTGACCTCACAAGTCAACGGT

LAF1C 181 CACAAGGTCGGCATGCGCAACGCCAGGATGCCATCTCCATGATGCAGACCGCCGAAGGC
LAF2C 181 CACAAGGTCGGCATGCGCAACGCCAGGATGCCATCTCCATGATGCAGACCGCCGAAGGT
LAFAH 181 CACAAGTGGTTATGCGCAACGCTCAGGATGCCATCTCTATGATTCAGACCGCTGAAAGC
FLAAC 181 CTGGACCAGGGCAACCGCAACGCCAACGACGGCATCTCCCTTGGTCTCAGACTGCTGAAGGG
FLABC 181 CTGGACCAGGGCAACCGCAACGCCAACGACGGTATCTCTCTGGCGCAGACTGCAGAAGGG
FLAAS 181 CTGGATCAAGGTAACCGTAACGCCAACGATGGCATTTCCGTTGGCCAGACCGCCGAAGGT
FLABS 181 CTGGACCAGGTTAACCGCAACGCCAACGATGGCATCTCTCTTGGTCTCAGACCGCTGAAGGC

```

LAFA1C 241 GCCATGGACGACATGACCAACATCGTTTCAGCGCATGAAGGACCTGGGCACCCAGGGTSCG
 LAFA2C 241 GCCCTGGACGAAATGACCAACATCGTTTCAGCGCATGAAGGACTCTGGGCACCCAGGGTGCC
 LAFAH 241 GCCATGGACGACATGACCAACATCACCAGCGCATGAAGATCTGGCTACCCAGGCGGCC
 FLAAC 241 GCGATGGATGAAGTGACCGGTATGCTGCAACGCGATGCGTACCCTGGCTCAACAATCCGCC
 FLABC 241 GCTATGGATGAAGTGACCGGTATGCTGCAAGCGTATGCGTACCTTGGCAACAACATCAGCC
 FLAAS 241 GCCATGGATGAAGTGACCTCATGCTGCAACGCGATGCGGACCCCTTGCTCAGCAATCTGCC
 FLABS 241 GCCATGGATGAAGTCACTTCCATGCTGCAAGCGTATGCGTACTCTGGCTCAGCAATCAGCC

 LAFA1C 301 AACGGCACTACAGCGCCGATGACTATACCGCCCTAAATGCCGAGTTCCGCCAACTGACC
 LAFA2C 301 AACGGCACTACAGCGCCGAAACTATCCCGCCCTGACCGCCGATTTCGGCCAACTGTCT
 LAFAH 301 AACGGTACCAACAGCAACCAAGGATCTTGATGCCATGACCGCGAGTTCAAGGAACTGGGT
 FLAAC 301 AACGGTTCCAACCTCCGCCAAGGATCGTGAAGCCCTGCAAAAAGAACTGGATCAGCGGT
 FLABC 301 AACGGTTCCAACCTCTGATAGGACAGAGCTGATTGCAGAAGGAAGTAAACCAGCTCGGG
 FLAAS 301 AACGGTTCCAACAACCCGATGACCGTACCGCTTTGCAGCAAGAGTACGACCAATTGATG
 FLABS 301 AACGGTTCCAACAACACTGATGACCGTACTGCTTGCAAGAGTATGATCAGTTGACC

 LAFA1C 361 AAGGAGCTGGGTAATATGTTAACAACACCAGCTTTGGTGGCCAGAACTGTTGAA...
 LAFA2C 361 ACCGAGCTGGGTAATATGTTAACAACACCAGCTTTGGTGGCCAAACTGTTGAA...
 LAFAH 361 AAAGAGCTGGGTAACATCCGTAACAACACCAGTTTCGGCGGCACTTCTCTGCTGAA...
 FLAAC 361 GCGGAGATCAACCGTATCTCCACTGCAACCACCTTTGCAGGACCAAGCTGCTTGATGGT
 FLABC 361 GCCGAATCAACCGTATCTCCAAGGACACCACCTTTCCCGGCACCAAGCTGCTGGATGGT
 FLAAS 361 ACCGAGATAGATCGTTCGCCCGGTGATACTACATTTGGCGGCCAGAAATTGCTTAATGGT
 FLABS 361 ACAGAGATCGATCGTATCTCCAGCGTACTACTCTTTGGTGGCCAAAACTGCTGGATGGT

 LAFA1C 417GGGTGGTTCGTTTGAGGTGCGCACTGCTGTGACTTTCCAGATT.....
 LAFA2C 417GGGTGGTTCGTTTGAGGTCCCACTGCTGTGACTTTCCAGATT.....
 LAFAH 417 ..AACCGGTGGCAAAATTCGAAGCTACTGCTGTGACTTTCCAAATT.....
 FLAAC 421 TCATTTAGCGGTACTTTCCAAGTAGGTGCTGATGCCAACAACAATCCGGTTTAGTTTG
 FLABC 421 AACTACAGCGGTAAATTCGAAGTCCGGGCTGATGCCAATCAGACCATTGGGTTTACCTTG
 FLAAS 421 GGGTATGAAGGCACTTTCCAAGTGGGTGCTGATGCGGGTCAGACCATTACTTTCCGATG
 FLABS 421 AACTACAAAGGTTCTTCCAAGTCCGGTGCCGATGCTGGTCAGACCATTAACCTTCAAGATG

 LAFA1C 460GGTGGCTCTAGCACTGAAACA
 LAFA2C 460GGTGGCTCTAGCACTGAAACA
 LAFAH 463GGTGCCAGCCTTGATGAGAAA
 FLAAC 481 GCGCAAAACAGGGGGTTTAGTATCTCTGGGATCGCAAAAGCTGCAGGAACCTACGATTGAT
 FLABC 481 TCTCAAGCCGAGGGTTCAAGATTTCTGGGATTCGCAAAAGCTGCAGGAGTACGATTGAT
 FLAAS 481ACCACTGCCCTTACCATATCTGGTATGGCATCTGCTACTAAGGGGAATGCAGTA
 FLABS 481ACGAGCGCTTCACTATCAGTGGTATTGCCGCCGCTCCAAGGGTAGTGCAACC

 LAFA1C 481 TTGAAGGTTGATGTTACTACCGCGATGAAGGACCTTACTGGCACTACAGCAACTAACGGT
 LAFA2C 481 TTGAAGGTTGATGTTACTACCGCGATGAAGGACCTTACTGGCACTACAGCAACTAGCGGT
 LAFAH 484 CTTGTCTTCGATGCATCCACCAAGTAACCGCGTCAACACCTCTATCAGTACTGCTCT
 FLAAC 541 ATTGTTCTCTGCTCCAGCAGGAGTGTAAACAACAGCGAGCGGTATCTCTCTTATTTCTCT
 FLABC 541 ATCGTATCTGCGCCCTGCAGGTAGTGTCAACAACGCGACTGGTATATCTCTAATCTTCTCT
 FLAAS 535 GTTGCAGCCACGACCGCAGGAAGCAAGAACCCTATAAAGTACGCGCTTCGACTACCGGG
 FLABS 535 GTTGCAGCCACTACGCGAGGTAGCAAGAAGCCCTATAAAGTAACATCTGGGACAAACCCG

 LAFA1C 541 ATTGCGGAC.....GGTATCGGTGATCAGAACAAAGCCAATGCCGCCATC
 LAFA2C 541 ACTGCCGACGCTGATATTGTCGCGGTATTGCTGATCAAAACAAAGCCAGTACCGCGATT
 LAFAH 544 CTTGCGGCC.....CTGACCACTGCTGCAGCTGCCGAGATT
 FLAAC 601 GCGCGCAGTGCAGGTGGGAT...CAGTATTAGCACTCAGAGTAAGGCCCAAGCCGTTTG
 FLABC 601 AGCGGTAGTGCAGGTGGCAT...CAGTATTAGTACTCAGAGCAAGGCCAAGCCGTTCTG
 FLAAS 595 AATGTTGCTGTTGCGGACATGAACAGTATCAACCGCTGCCAGCTCAGCCAGTCTGCCATG
 FLABS 595 ...GTGACCGTCCCAACATGAATAGCATCAAGCGCGCGAGTTCTGCTCAATCGGCCATG

 LAFA1C 586 ACCGAGATGGAAACCTTCCTGAAGACATCGGCAGCCGCCGTTCTCTCTCGGTGCCAAC
 LAFA2C 601 ACCGCCACAAGCAACCTGCTTGATCAAAATGGTCTCTCTCTCTCTCTCGGTGCCAAC
 LAFAH 580 ACTGCCATGGACAGCATGCTGGAGAAAGATCGGTGAACCTCGTTCTGCTCTCGGTGCCAAC
 FLAAC 658 GCTGCTCTGATCTATGTTGGAAGTCTGATAGTACCAAGCGACAGAACTGGGTGCGGTG
 FLABC 658 GCCGACCTGATGCTATGTTGGAAGTATGTTGATGGCAAGCGTCTGAGCTGGGCGCGGTG
 FLAAS 655 GCTAACCTGACTACATGATCAAGGTGGTGGACAGCAAGCGTGCGGAATTGGGTGCGGTA
 FLABS 652 GCCAACCTTGACTTCATGATCAAGGCGGTTGACAGCAAAACGCGCAGAGCTGGGTGCGGTG

| | | | |
|-------|-----|--------------------------|---|
| LAF1C | 646 | ATCAACCGTCTGGAGCA | CACCGTCAACAACCTCTCCAACATGAAAGAGAACAACCGACATG |
| LAF2C | 661 | ATCAACCGTCTGGAGCA | CACCGTCAACAACCTCTCCAACATGAAAGAGAACAACCGACATG |
| LAFAH | 640 | ATCAACCGTCTGGAGCA | CACCGTCAACAACCTTTCCAACATGAAAGAGAACAACCTGACATG |
| FLAAC | 718 | CAGAACCGTCTGGATTCCACCATT | TCGCAACCAGGCCAATATCTCGGAAACGTTAAGCGCA |
| FLABC | 718 | CAGAACCGTCTGGATTCCACCATT | TCGCAACCAGGCCAATATCTCGGAAACGTTAGCGCA |
| FLAAS | 715 | CAGAACCGGTTTGACTCG | TACCATTCCGCAACCAGGCCAATATCTCGGAAACGTTCAATGCA |
| FLABS | 712 | CAGAACCGGTTTGACTCG | TACCATTTCGCAACCAGTCCAACGTTCTCTGAAACCTTGATGCA |
| | | | |
| LAF1C | 706 | GCGAACGGTCGCATCATG | GATGCGGACTTCGGCTCAGGAGAGCAACCAACATGACCAAGAAC |
| LAF2C | 721 | GCGAACGGTCGCATCATG | GATGCGGACTTCGGCTCAGGAGAGCAACCAACATGACCAAGAAC |
| LAFAH | 700 | GCGAATGGTCGCATCATG | GATGCGGACTTCGGCTCAGGAAAGCAACCAATATGACCAAGAAC |
| FLAAC | 778 | GCCCGTTCTCGTATCCG | CGATGCAAGATTTTGCAACCGGAGACCGCCAATATGACCAAGCAG |
| FLABC | 778 | GCCCGTTCTCGTATCCG | CGATGCAAACTTTGCGACAGAAACCGCCAACATGACCAAGCAT |
| FLAAS | 775 | GCTCGTCTCAGTATTTCG | TGACGACGACTTCGGCAGCGAAACGGCCAACCTGACCAAGCAA |
| FLABS | 772 | GCCCGTCTCGTATTTCG | TGACGCGGACTTTGCGACTGAAACAGCCAACCTGACCAAGCAG |
| | | | |
| LAF1C | 766 | CAGATGTTGATG | CAGGCTGGCATGTCCCTGGTGTCCAACCTCCAACCAGATGACCGGCATG |
| LAF2C | 781 | CAGATGTTGATG | CAGGCTGGCATGTCCCTGGTGTCCAACCTCCAACCAGATGACCGGCATG |
| LAFAH | 760 | CAGATGTTGATG | CAGGCTGGCATGTCCCTTCTGTCCAACCTCCAACCAGATGACCGGTATG |
| FLAAC | 838 | AATATCTTGCAACAGGC | CGCTTCCAGCATCCTGCCCCAGGCCAATCAGCGTCCGTCAGTCT |
| FLABC | 838 | AATATCTTGCAACAGGC | CGCTTCCAGCATCCTGCCCCAGGCCAACCAGCGTCCCGAGTCT |
| FLAAS | 835 | AACATTTTGCAACAGAG | CTGCATCCACCATACTGTACAGGCCAACCAGCGTCCGTCAGTCT |
| FLABS | 832 | AACATTTTGCAACAGGC | CGCTTCCAGCATCTTGGCGCAAGCCAACCAAGACCGTCAGTCT |
| | | | |
| LAF1C | 826 | GTGACCTCCCTGCTGCGTTGA | ~~~~ |
| LAF2C | 841 | GTGACCTCCCTGCTGCGTTGA | ~~~~ |
| LAFAH | 820 | GTAACTGGTCTGCTGCGTTAA | ~~~~ |
| FLAAC | 898 | GCGCTCTCCCTGCTGCGA | GAATAAA |
| FLABC | 898 | GCACTGCACTGCTGCGTTAA | ~~~~ |
| FLAAS | 895 | GCCCTCTGTTGCTGCA | AGGCTAA |
| FLABS | 892 | GCCCTCTCCCTGCTGCGTTAA | ~~~~ |

Figura 3.C.1 Alineamiento de diferentes flagelinas de *Aeromonas* spp. LAF1C y LAF2C (*lafA1* y *lafA2* de *A. caviae*), LAFAH (*lafA* de *A. hydrophila*, FLAAC y FLABC (*flaA* y *flaB* de *A. caviae*), FLAAS y FLABS (*flaA* y *flaB* de *A. salmonicida*). Los nucleótidos marcados en color rojo representan los cebadores LAF1 (N-terminal) y LAF2 (C-terminal) respectivamente.

3.C.1.1.2 Distribución de flagelinas laterales según PCR LAF1-LAF2

Usando como controles positivos las dos cepas, *A. hydrophila* AH-3 (producto de 552 pb) y *A. caviae* Sch3N (sendos productos de 558 y 573 pb respectivamente, indiferenciables en gel de agarosa), se examinaron mediante la PCR LAF1-LAF2, los serotipos del O:1 al O:44 de *Aeromonas*, así como 100 cepas de *Aeromonas* mesófilas con diferente procedencia- clínica, alimentaria y de peces moribundos respectivamente- así como las cepas de referencia según el grupo de hibridación (HG) y la cepa *A. veronii* bv. *sobria* AH-1. En todos los casos se realizó la PCR por duplicado y con una Tª de hibridación ADN/ cebador de 58°C con 40 segundos de extensión.

Un 60% de las cepas de *Aeromonas* mesófilas mostraron una banda de amplificación del tamaño esperado, mientras que un 40% o bien no mostraban amplificación, o el producto de ésta era aberrante por tamaño. Algunas de las bandas amplificadas se confirmaron mediante secuenciación.

Las cepas positivas para la PCR LAF1-LAF2 se distribuyeron del siguiente modo: 62% de procedencia clínica (31 de 50), 55% aisladas a partir de alimentos (22 de 40) y 70% aisladas de peces (7 de 10). Según estos resultados no se encontraba una clara asociación entre la especie y la posesión de flagelo lateral. De entre las cepas de referencia según los grupos de hibridación, únicamente 5 de ellas mostraban amplificación, HG4, HG5a, HG6, HG9 y HG12, mientras que un 50% de los diferentes serotipos de *Aeromonas* (O:1, O:2, O:3, O:4, O:7, O:9, O:11, O:12, O:14, O:15, O:16, O:17, O:19, O:25, O:26, O:28, O:37, O:38, O:39, O:40, O:42 y O:44) mostraron una banda de amplificación de aproximadamente 550 pb.

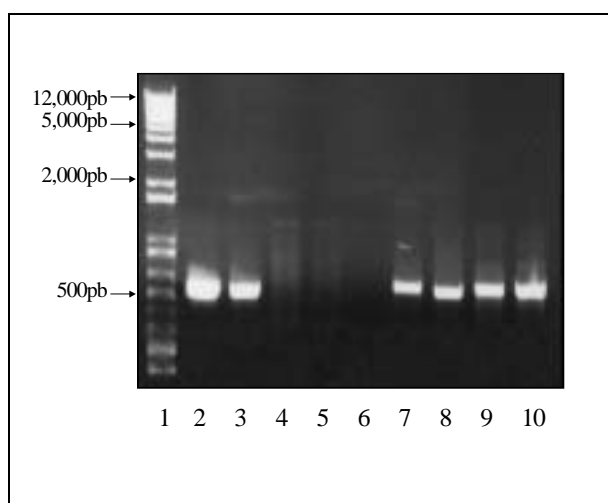


Figura 3.C.2 Amplificación por PCR de diferentes ADNs genómicos de *Aeromonas* spp. con los cebadores LAF1 y LAF2. Marcador de peso molecular, 1 kb de PLUS DNA Ladder de Invitrogen (línea 1), *A. hydrophila* AH-3 (línea 2), *A. caviae* Sch3N (línea 3), 3 cepas de *Aeromonas* mesófilas negativas (líneas 4, 5 y 6) y cuatro cepas de *Aeromonas* mesófilas positivas (líneas 7, 8, 9 y 10).

3.C.1.1.3 Número de flagelinas laterales

Con tal de comprobar si las cepas de *Aeromonas* que poseían flagelina lateral según el resultado de la PCR LAF1-LAF2 seguían el patrón de *A. hydrophila* (1 flagelina lateral) o *A. caviae* Sch3N (2 flagelinas laterales), se hizo de nuevo un alineamiento de las secuencias en nucleótidos, incluyendo en este caso el gen adyacente a *lafA* en *A. hydrophila* y a *lafA2* en *A. caviae*, *lafB*, también altamente conservado. Se diseñó el cebador LAF5, 100% idéntico en ambas secuencias para realizar la PCR LAF1-LAF5, con una T^a de hibridación ADN/cebador de 58°C y un tiempo de extensión de 2 minutos y 40 segundos. Esta PCR se llevó a cabo por duplicado en la misma población estudiada para la posesión de flagelina lateral, con los controles, *A. hydrophila* AH-3, donde se amplificó una banda de 1715 pb (*lafA-lafB*) y *A. caviae* Sch3N cuyos productos fueron dos bandas de 2751 pb (*lafA1-lafB*) y 1737 pb (*lafA2-lafB*) respectivamente.

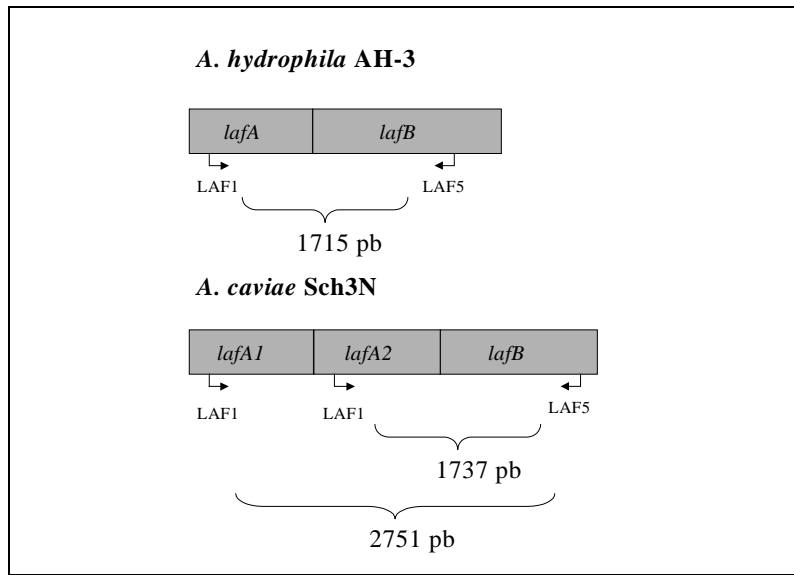


Figura 3.C.3 Representación gráfica de los fragmentos amplificados con los cebadores LAF1 y LAF5 en las cepas AH-3 y Sch3N respectivamente.

Únicamente 5 (8%) del 60% de *Aeromonas* spp. mesófilas que presentaban flagelina lateral mostraron el doble bandeo que encontrábamos en *A. caviae*, correspondiendo respectivamente a dos cepas de origen clínico (*A. veronii* bv. *sobria* y *A. caviae*), dos cepas aisladas de alimentos (*A. hydrophila* y *A. veronii* bv. *veronii*) y una cepa aislada de peces (*A. veronii* bv. *sobria*). Ninguno de los HGs de referencia que producían flagelo lateral poseían el doblete de flagelinas mientras que de los 44 serogrupos O, dos de ellos (O:11 y O:42) producían doble banda en la amplificación LAF1-LAF5.

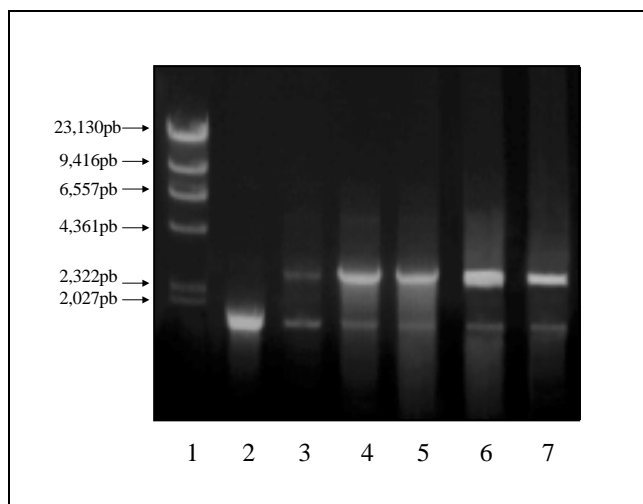


Figura 3.C.4 Foto PCR Amplificación por PCR de diferentes ADNs genómicos de *Aeromonas* spp. con los cebadores LAF1 y LAF5. Marcador de peso molecular, ADN de 8 digerido con *HindIII* (línea 1), *A. hydrophila* AH-3 (línea 2), *A. caviae* Sch3N (línea 3), 4 cepas de *Aeromonas* mesófilas que presentan dos flagelinas laterales (líneas 4, 5, 6 y 7).

3.C.1.1.4 Distribución de flagelina lateral mediante colony blot

Se analizaron mediante colony blot las mismas cepas de *Aeromonas* mesófilas estudiadas mediante PCR. La sonda empleada fue el producto de la amplificación con los cebadores LAF1-LAF2 sobre el cósmido pCOS-LAF, los mismos usados para la amplificación de flagelina lateral en las diferentes cepas. Los resultados obtenidos confirmaron que el 60% mostraba flagelina lateral mientras que el 40% restante o bien no hibridaba o la marca era muy tenue.

3.C.1.1.5 Producción de flagelina/flagelo lateral en las diferentes *Aeromonas* spp. mesófilas

Se eligieron al azar 10 de las cepas que habían amplificado la flagelina lateral en la PCR LAF1-LAF2 así como 20 cepas negativas para la misma con el fin de comprobar la producción de flagelina lateral en las mismas. Para ello se obtuvieron proteínas totales de cada una de las cepas a partir de crecimientos en placa y con el uso de anticuerpos policlonales específicos para la flagelina lateral se determinó, mediante el protocolo descrito en Material y Métodos, la existencia de dicha flagelina en cada una de las muestras. Paralelamente se realizó la observación de las mismas cepas mediante microscopía electrónica de transmisión y también a partir de crecimientos en placa. A partir de los resultados de ambas pruebas se encontró una correlación del 100% entre cepas positivas/negativas para la PCR y presencia/ausencia de flagelo lateral respectivamente.

Del mismo modo se confirmó que aquellas cepas que presuntamente expresan flagelo lateral, eran capaces de presentar “swarming” en placa.

3.C.1.2 El locus *laf* completo en *Aeromonas* mesófilas

Con el objetivo de determinar si la distribución génica en el locus *laf* era similar en otras cepas de *Aeromonas* mesófilas, se emplearon los cebadores LAF1 y LAF9, localizados respectivamente en el primer y último gen del locus en *A. hydrophila* AH-3, los cuales amplifican por PCR una banda simple de 7120pb en la cepa de origen, o bien en el cósmido pCOS-LAF, realizando la reacción de amplificación a una temperatura de hibridación ADN/cebador de 56°C y aplicando un tiempo de extensión de 7 minutos y 30 segundos, además de hacer uso de la *Taq Platinum ADN polymerase*. Bajo las mismas condiciones se aplicó la PCR a las cepas *A. caviae* Sch3N y *A. veronii* bv. *sobria* AH-1, obteniendo en ambos casos un producto de amplificación simple y de un tamaño similar a la banda de AH-3. Mediante secuenciación de cada uno de los extremos de los productos obtenidos de cada cepa, se confirmó la presencia de los genes *lafA* y *lafU*

respectivamente y en ambas. La poca distancia entre las dos flagelinas de AH-1 y Sch3N no permitía diferenciar más de una banda de amplificación.

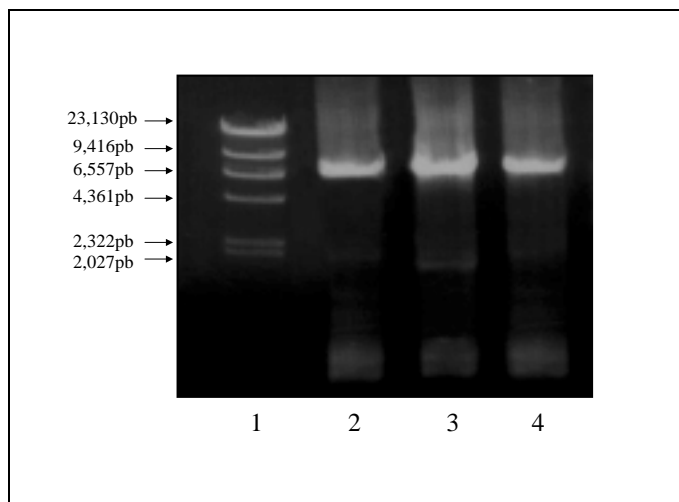


Figura 3.C.5 Amplificación por PCR de diferentes ADNs genómicos de *Aeromonas* spp. con los cebadores LAF1 y LAF9. Marcador de peso molecular, ADN de 8 digerido con *Hind*III (línea 1), *A. hydrophila* AH-3 (línea 2), *A. caviae* Sch3N (línea 3), *A. veronii* bv. *sobria* AH-1 (línea 4).

3.C.1.3 Expresión en *trans* del locus *laf* de *A. hydrophila*

3.C.1.3.1 Transformación en diferentes cepas de *Aeromonas* sin flagelo lateral

De las cepas de *Aeromonas* mesófilas analizadas, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC9071, *A. hydrophila* ATCC7966 y *A. caviae* AH-2020, eran capaces de moverse en medio líquido pero no poseían flagelina/flagelo lateral, con lo cual no producían “swarming” en placa. Por ello fueron elegidas para transformarlas mediante conjugación con el cósmido pCOS-LAF contenido en *E. coli* DH5 α . Para ello se obtuvieron mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de cada una de las cepas para seleccionar los transconjugantes de la conjugación triparental a la que fueron sometidas. Las mismas cepas se transformaron, también mediante conjugación triparental con el cósmido pLA2917 sin inserto a modo de control.

Mediante la PCR LAF1-LAF2 se confirmó la presencia de flagelina lateral en cada una de las cepas ATCC9071, ATCC7966 y AH-2020 con el cósmido pCOS-LAF en su interior, y a diferencia de cada una de las respectivas cepas parentales, mientras que las mismas con pLA2917 en su interior continuaban siendo negativas en la PCR.

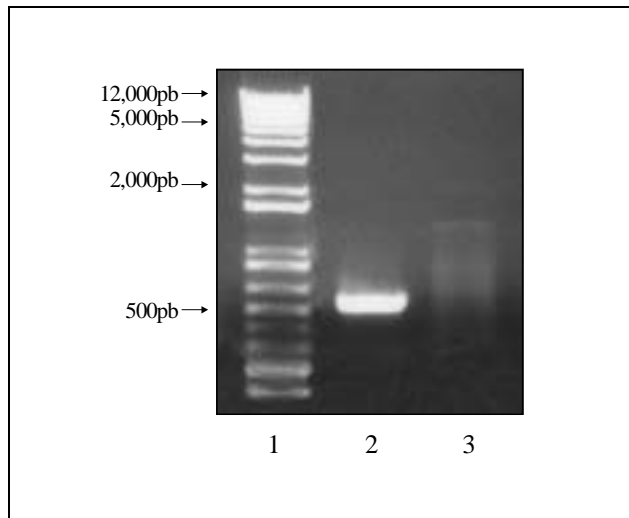


Figura 3.C.6 PCR Amplificación de fragmentos de ADN con los cebadores LAF1-LAF2 sobre el ADN total de *A. hydrophila* ATCC7966 con el cósmido pCOS-LAF (línea 2) y con pLA2917 sin inserto (línea 3). En la línea 1 se encuentra el marcador de peso molecular 1 kb de PLUS DNA Ladder de Invitrogen.

3.C.1.3.1.1 Flagelo lateral en los transconjugantes

Para cada uno de las tres cepas transconjugantes de ATCC9071, ATCC7966 y AH-2020 se realizaron estudios sobre la realización de “swarming”, resultando positiva para las tres cepas. Además se analizó la presencia de flagelo lateral en cada uno de ellos mediante microscopía electrónica de transmisión y la presencia de flagelina lateral mediante Western blot de proteínas totales, en ambos casos partiendo de crecimientos en placa. Tanto la flagelina como el flagelo lateral se expresaba en las cepas transconjugantes, teniendo en cuenta que siempre se usaron como control negativo las mismas cepas transformadas mediante conjugación con el cósmido pLA2917 sin inserto.

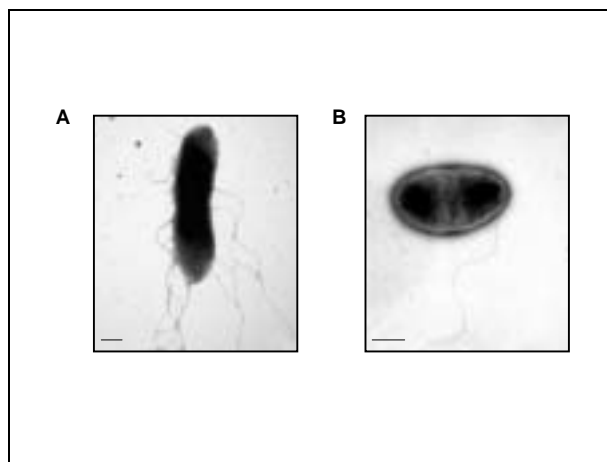


Figura 3.C.7 Microscopía electrónica de transmisión de *A. hydrophila* ATCC7966 con el cósmido pCOS-LAF (A), o pLA2917 sin inserto (B). Barra: 0,5 :m

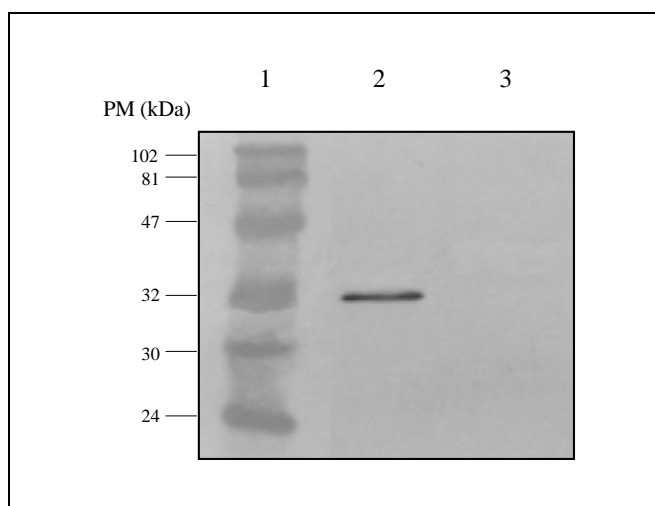


Figura 3.C.8 Western blot de *A. hydrophila* ATCC7966 con el cósmido pCOS-LAF (línea 2), o pLA2917 sin inserto (línea 3), en la línea 1 se encuentra el marcador de peso molecular.

3.C.1.3.1.2 Estudios fenotípicos de los transconjugantes

Se realizaron ensayos de adhesión e invasión a células epiteliales HEp-2, tal y como se describe en Material y Métodos, con cada una de las cepas transconjugantes *A. veronii* bv. *sobria* ATCC9071, *A. hydrophila* ATCC7966 y *A. caviae* AH-2020 con los cósmidos pCOS-LAF y pLA2917 respectivamente. Las tres cepas portadoras del pCOS-LAF mostraban incrementada tanto su capacidad de adhesión como la de invasión respecto de las cepas salvajes o las mismas con pLA2917 en su interior. El control negativo para los ensayos de invasión fue la cepa HB101 de *E. coli* que muestra un porcentaje de invasión de $0,04 \pm 0,004\%$. Los valores se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes ($P < 0,0005$).

| Cepa | Nº medio bacterias/Célula HEp-2 \pm SD ^a | Invasión de células HEp-2 ^a |
|--|---|--|
| <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 | $3,7 \pm 0,9$ | $0,27 \pm 0,005$ |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC9071 | $6,5 \pm 1,3$ | $0,34 \pm 0,008$ |
| <i>A. caviae</i> AH-2020 | $4,9 \pm 1,1$ | $0,32 \pm 0,009$ |
| ATCC7066 + pCOS-LAF | $15,2 \pm 2,7$ | $0,93 \pm 0,012$ |
| ATCC9071 + pCOS-LAF | $28,7 \pm 4,1$ | $1,17 \pm 0,015$ |
| AH-2020 + pCOS-LAF | $25,0 \pm 3,6$ | $1,08 \pm 0,015$ |
| ATCC7966 + pLA2917 | $3,8 \pm 1,0$ | $0,29 \pm 0,006$ |
| ATCC9071 + pLA2917 | $6,9 \pm 1,5$ | $0,32 \pm 0,009$ |
| AH-2020 + pLA2917 | $4,7 \pm 1,6$ | $0,33 \pm 0,007$ |

Tabla 3.C.1 Adhesión e invasión a/de células HEp-2.

a Los números representan el número medio de adhesión obtenido \pm la desviación estándar.

Del mismo modo analizamos la habilidad de cada una de ellas para formar biofilms, resultando ésta también incrementada en las cepas que expresan pCOS-LAF en *trans*, y a diferencia de cada una de las cepas parentales o controles negativos (transformadas con pLA2917). Los valores se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes ($P < 0,0005$).

| Cepa | Habilidad para la formación de biofilm $OD_{570} \pm SD^a$ |
|--|--|
| <i>A. hydrophila</i> ATCC7966 | $0,4 \pm 0,1$ |
| <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> ATCC9071 | $0,6 \pm 0,2$ |
| <i>A. caviae</i> AH-2020 | $0,4 \pm 0,1$ |
| ATCC7066 + pCOS.LAF | $1,0 \pm 0,2$ |
| ATCC9071 + pCOS-LAF | $1,4 \pm 0,3$ |
| AH-2020 + pCOS-LAF | $1,2 \pm 0,2$ |
| ATCC7966 + pLA2917 | $0,5 \pm 0,2$ |
| ATCC9071 + pLA2917 | $0,5 \pm 0,2$ |
| AH-2020 + pLA2917 | $0,4 \pm 0,1$ |

Tabla 3.C.2 Habilidad para la formación de biofilm *in vitro*.

a Los números representan el valor medio de densidad óptica obtenido \pm la desviación estándar.

3.C.2 Discusión

Por su estructura en dominios, los genes de las flagelinas son candidatos ideales para la amplificación mediante PCR (Winstanley and Morgan, 1997), lo que supone un método ya empleado para la detección de bacterias específicas, *Campylobacter coli* y *C. jejuni* (Oyoyo y Rollins, 1993; Rasmussen y col., 1996), *Borrelia burgdorferi* (Picken, 1992), *Salmonella* spp. (Way y col., 1993) o *Listeria* spp. (Gray y Kroll, 1995). Por ello, se diseñó una PCR, basándonos en los dominios conservados N- y C-terminales de las flagelinas del género, que nos permitiese detectar las flagelinas laterales pero que a la vez no amplificase las polares.

En este estudio se concluyó que aproximadamente un 60% de las cepas del género poseían flagelina lateral, algo que se confirmó mediante hibridación de ADN, o

bien analizando directamente la posesión de flagelina y/o flagelo lateral respectivamente mediante Western blot y microscopía electrónica. La distribución encontrada fue de 62% en aislados clínicos, 55% en aislados de alimentos y un 70% en aislados a partir de peces. Y aunque no se encontró una clara asociación entre las cepas que mostraban flagelo lateral y las especies, estos resultados además coincidían con Kirov y col., (2002) que también mostró la relación directa entre las cepas que poseen la flagelina lateral y aquellas que exhiben “swarming” sobre superficies, de modo similar a nuestras correlaciones entre detección de flagelina lateral por PCR y “swarming” en placa, demostrando además que el flagelo lateral es el responsable de este tipo de movilidad. Quizás debido al bajo número poblacional empleado en la sección B de este trabajo, los resultados del dot blot mostraban que el 100% de las *Aeromonas* mesófilas poseían los genes del flagelo lateral, no coincidiendo con los obtenidos en esta sección, analizando mediante PCR la posesión de flagelina lateral en una más grande y heterogénea población de *Aeromonas*.

También se empleó PCR para estudiar la posesión de una o dos flagelinas en el género, lo que llevó a concluir que aunque la mayoría de cepas poseen una única flagelina lateral como *A. hydrophila*, un 8% de las cepas estudiadas poseían el patrón de *A. caviae*, con un doblete de flagelinas laterales. Y con otra PCR se determinó la similitud en la organización genética del locus *laf* entre las cepas *A. hydrophila* AH-3, *A. caviae* Sch3N y *A. veronii* bv. *sobria* AH-1, las especies de *Aeromonas* más importantes clínicamente. Éstas mostraban una distancia similar entre sus flagelinas y el último gen del locus, además de hibridar las tres cepas con las sondas para *lafB-C*, *lafX-S* y *laf T-U* respectivamente en la sección B de este trabajo.

La limitada distribución del flagelo lateral entre las *Aeromonas* mesófilas parece ir en contra de su importante papel en el proceso de colonización o en la patogénesis general del género, sin embargo, hay un gran espectro de manifestaciones clínicas asociadas a infecciones por *Aeromonas*, por lo que diferentes combinaciones de los distintos determinantes patogénicos deben conducir a las diferentes sintomatologías encontradas, tal y como ocurre para varias patologías descritas en *E. coli*. En la sección B de este trabajo concluimos que el flagelo lateral de *Aeromonas* jugaba un importante papel en el proceso de adhesión así como en la formación de biofilm, propiedades que hemos corroborado estudiando algunas cepas salvajes incapaces de producir dicho flagelo. Mediante la introducción del cósmido pCOS-LAF en las tres cepas de *Aeromonas* mesófilas, *A. veronii* bv. *sobria* ATCC9071, *A. hydrophila* ATCC7966 y *A. caviae* AH-2020, demostramos que los 9 genes clonados del sistema de flagelación lateral son suficientes para expresar dicha flagelación inducida, además de mostrar una correlación

entre la presencia de dicha flagelación y el aumento de aproximadamente 3 veces en los niveles de adhesión e invasión o una duplicación en la habilidad para la formación de biofilms *in vitro*. Tanto la formación de biofilms (Costerton y col., 1999), como la movilidad mediante “swarming” y la invasión en infecciones por *Proteus mirabilis* (Allison y col., 1992), así como la capacidad de adhesión son factores implicados en las infecciones persistentes, por lo que de nuestros resultados parece evidente concluir que la presencia de flagelación lateral así como la movilidad mediante “swarming” son factores de patogenicidad de las cepas de *Aeromonas* mesófilas que los presentan.

3.D.1 Resultados

Tras mostrar que aproximadamente un 60% de las *Aeromonas* mesófilas poseen los genes para la expresión de flagelación lateral, investigamos la posibilidad de encontrar dichos genes en diferentes cepas de *A. salmonicida*, especie del género considerada inmóvil a pesar de que un pequeño porcentaje pueda expresar el flagelo polar bajo determinadas circunstancias.

3.D.1.1 Presencia y expresión de genes *laf*

3.D.1.1.1 Detección de la flagelina lateral mediante PCR

Sirviéndonos del alineamiento de las flagelinas laterales y polares de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. realizado en la sección C de este trabajo (Figura 3.C.1), empleamos los cebadores diseñados, LAF1 y LAF2 para aplicar la PCR correspondiente sobre diferentes cepas de la especie *A. salmonicida*.

Se emplearon concretamente 50 cepas de esta especie psicrófila, entre las cuales se encontraba la cepa A450. De todas ellas, un 100% mostró una banda de amplificación de aproximadamente 550 pb, tal y como era de esperar en caso de que poseyesen flagelina lateral, de modo similar a ambos controles, *A. hydrophila* AH-3 y *A. caviae* Sch3N. Algunos de los productos amplificados se confirmaron mediante secuenciación del mismo.

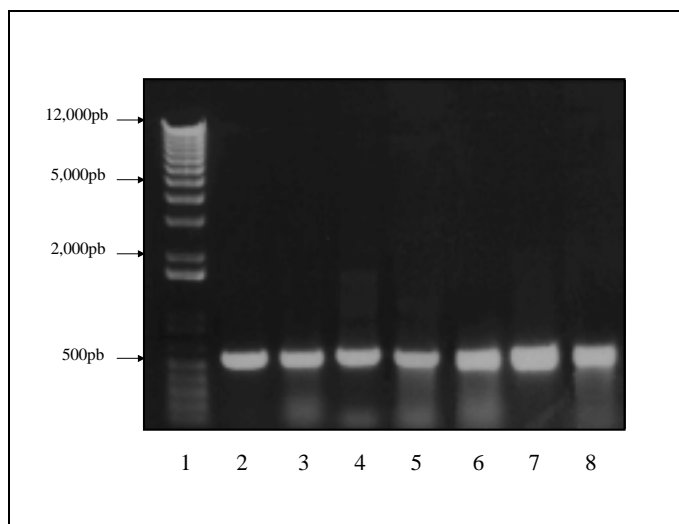


Figura 3.D.1 Amplificación mediante PCR de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. usando los cebadores LAF1-LAF2. Marcador de peso molecular, 1 kb del PLUS DNA Ladder de Invitrogen (línea 1), *A. caviae* Sch3N (línea 2), *A. hydrophila* AH-3 (línea 3), *A. salmonicida* A450 (línea 4) y cuatro cepas de *A. salmonicida* (líneas 5, 6, 7 y 8).

3.D.1.1.2 Detección de flagelina lateral mediante colony blot

La sonda obtenida de marcar el producto de amplificación de los cebadores LAF1-LAF2 sobre el ADN del cósmido pCOS-LAF (que contiene los 9 genes, de *lafA* a *lafU* de *A. hydrophila*), se empleó para estudiar mediante colony blot las mismas 50 cepas de *A. salmonicida*, estudiadas anteriormente por PCR. En todos los casos hubo una completa correlación entre el resultado de la PCR y de la hibridación, siendo por lo tanto todas ellas positivas.

3.D.1.1.3 Movilidad mediante “swarming”

Se sembraron en placas de agar semisólido las 50 cepas del estudio, y se incubaron a 20°C durante toda la noche. Ninguna de las cepas de *A. salmonicida* fue capaz de producir “swarming” en las placas a diferencia de un elevado número de *Aeromonas* spp. mesófilas que sí presentan este tipo de movilidad.

3.D.1.1.4 Producción de flagelina/flagelo lateral

Para poder explicar la incapacidad de realizar “swarming” de *A. salmonicida*, se eligieron algunas de las cepas al azar para detectar, a partir de proteínas totales extraídas de crecimientos en placa, la producción de flagelina lateral haciendo uso de la técnica de Western blot, tal y como describimos en Material y Métodos, y usando anticuerpos policlonales anti-flagelina lateral. En ninguno de los casos detectamos la flagelina.

También se pusieron a crecer en placa las mismas cepas, incubándolas a 20°C, para realizar microscopía electrónica de transmisión tras el crecimiento en medio sólido. La producción de flagelo lateral fue negativa en todos los casos.

3.D.1.1.5 Número de flagelinas laterales

De mismo modo que se determinó, en la sección de resultados anterior, el número de flagelinas laterales en diferentes aeromonas mesófilas, procedimos al mismo análisis en las diferentes cepas de *A. salmonicida*. Nos basábamos en la PCR LAF1-LAF5 cuyo producto difería entre los controles; *A. hydrophila* AH-3, donde se amplificaba una banda de 1715 pb (*lafA-lafB*) y *A. caviae* Sch3N cuyos productos eran dos bandas de 2751 pb (*lafA1-lafB*) y 1737 pb (*lafA2-lafB*) respectivamente (Figura 3.C.3), En todas las muestras de *A. salmonicida* se obtuvo una banda simple de 2952 pb, lo que nos llevó a secuenciar la misma para confirmar que se tratase de la región *lafA-lafB*, además de para poder explicar las diferencias de tamaño encontradas.

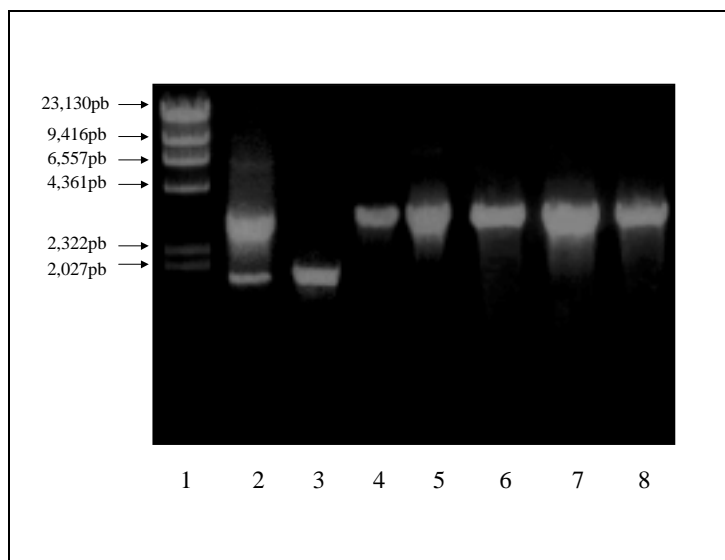


Figura 3.D.2 Amplificación mediante PCR de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. usando los cebadores LAF1-LAF5. Marcador de peso molecular, ADN de 8 digerido con *Hind*III (línea 1), *A. caviae* Sch3N (línea 2), *A. hydrophila* AH-3 (línea 3), *A. salmonicida* A450 (línea 4) y las cuatro cepas de *A. salmonicida* usadas en la figura 3.D.1 (líneas 5, 6, 7 y 8).

De la secuencia completa de la banda amplificada en 10 cepas de *A. salmonicida* se pudo deducir que esta especie (o al menos las cepas empleadas en el estudio) poseía una única flagelina, *lafA*, y que dicha flagelina poseía una putativa transposasa-8 de la familia IS3 inserida en su secuencia. Esta putativa transposasa mostraba alta identidad y similitud (sobre 60% y 75% respectivamente) con la transposasa *tnpA* de *Pseudomonas putida* o *Erwinia carotovora*; así mismo mostraba homología con diferentes transposasas de *Pantoea agglomerans*, *Xanthomonas campestris* o *Agrobacterium tumefaciens*. En el inicio de la secuencia se encontraba una típica región transposasa así como en el final de la misma encontrábamos un dominio conservado del núcleo de la integrasa.

3.D.1.2 El locus *laf* completo en *A. salmonicida*

3.D.1.2.1 Amplificación del locus *laf* en *A. salmonicida* A450

Se emplearon en PCR los cebadores LAF1-LAF9, los cuales tal y como indica la sección C de este trabajo amplifican una banda de aproximadamente 7120 pb en al menos 3 cepas de *Aeromonas* mesófilas, entre ellas la cepa de origen *A. hydrophila* AH-3. El producto de amplificación además contiene los nueve genes del locus *laf* (el primero y último incompletos). La PCR se realizó sobre *A. salmonicida* A450 bajo las mismas condiciones ya empleadas y de nuevo con la *Taq Platinum ADN polymerase*, obteniendo en este caso una banda de 8360 pb, debido al tamaño añadido del transposón insertado y descrito anteriormente.

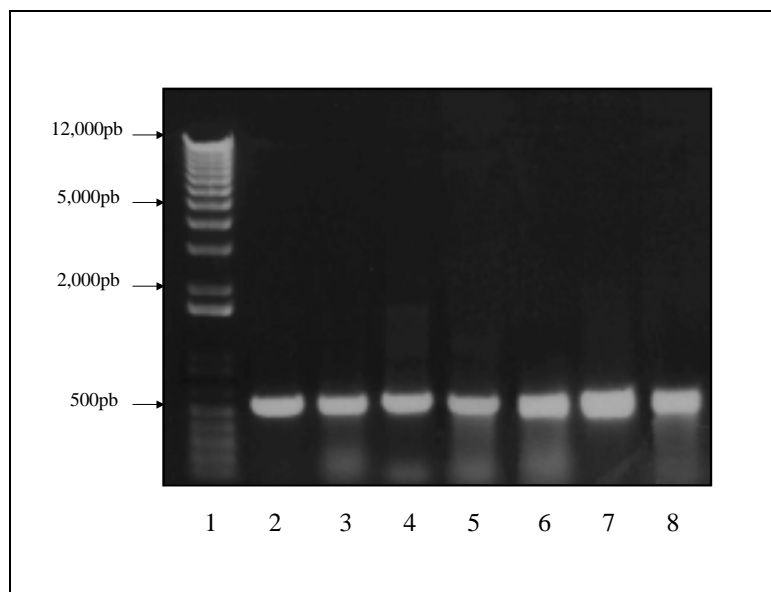


Figura 3.D.3 Amplificación mediante PCR de diferentes cepas de *Aeromonas* spp. usando los cebadores LAF1-LAF9. Marcador de peso molecular, ADN de 8 digerido con *Hind*III (línea1), *A. hydrophila* AH-3 (línea 2), *A. salmonicida* A450 (línea 3) y dos cepas de *A. salmonicida* (líneas 4 y 5).

3.D.1.2.2 Secuenciación del locus *laf* en *A. salmonicida* A450

Dicha banda se secuenció con los dos cebadores empleados en la amplificación, y además de confirmar que se trataba del locus *laf*, de las secuencias obtenidas se diseñaron nuevos cebadores específicos para completar la secuencia en ambas direcciones. En algunos casos dichos cebadores eran 100% idénticos con otros diseñados previamente en *A. hydrophila* AH-3, con lo cual se emplearon los mismos.

3.D.1.2.2.1 Secuenciación de los extremos del locus

Como los cebadores LAF1 y LAF9 hibridaban con sendas secuencias internas de los genes *lafA* y *lafU* respectivamente, los extremos de ambos genes no se encontraban en la banda amplificada y secuenciada con dichos oligonucleótidos. Esto nos llevó a usar rutas alternativas para completar la secuencia del locus. Por un lado se empleó la técnica de secuenciación directa de ADN cromosómico con el cebador LAFA2, lo que nos permitió completar la secuencia nucleotídica del gen *lafA*. En el caso del gen *lafU* la secuenciación se completó tras la obtención de fragmentos de ADN cromosómico digeridos y posteriormente religados. Para ello, el material cromosómico de *A. salmonicida* se digirió con la enzima de restricción *Bam*HI, diana encontrada en el interior ya secuenciado del gen *lafU*. Se procedió entonces a ligar el conjunto de bandas obtenido tras la digestión, de manera que todo el material quedase recircularizado. Posteriormente se empleó este material como ADN molde en una reacción de PCR

llevada a cabo con los cebadores divergentes en la secuencia de *lafU*, LAF4 y LAFU2. La reacción se llevó a cabo con la *Taq Platinum ADN polymerase*, y con un largo tiempo de extensión, 8 minutos, dado que no se conocía la siguiente diana de restricción *Bam*HI en la secuencia posterior a *lafU*. La temperatura de hibridación ADN/cebador fue de 58°C. De la PCR obtuvimos una banda de amplificación de 1297 pb, con la que completamos la secuencia del gen *lafU*.

Se analizó la secuencia obtenida para las posibles ORFs encontrando la misma distribución que en *Aeromonas* mesófilas, 9 putativos genes que por homologías encontradas en las bases de datos se correspondían con *lafA*, *B*, *C*, *X*, *E*, *F*, *S*, *T*, y *U* respectivamente y transcritos en la misma dirección. Así mismo las 9 ORFs poseían putativas secuencias Shine Dalgarno en la secuencia anterior a cada uno de los respectivos codones de inicio. Sólo un putativo terminador transcripcional se localizó entre los genes *lafA* y *lafB*, lo que sugería, como en el caso de *A. hydrophila* AH-3, que los 8 genes *lafB-U* podrían formar una única unidad transcripcional. Además una putativa secuencia promotora σ^{54} precede la región codificadora de *lafA*. De *lafB* a *lafU*, la homología en la secuencia de ADN entre *A. salmonicida* y *A. hydrophila* AH-3 es como mínimo del 90%, por lo que omitiremos la descripción de cada una de las ORFs de A450. Una décima ORF, la ORF2 por localización en la secuencia, codificaba para la transposasa y se transcribía en dirección opuesta al resto. Esta ORF interrumpía a la ORF1 que se encontraba seccionada en dos ORFs parciales.

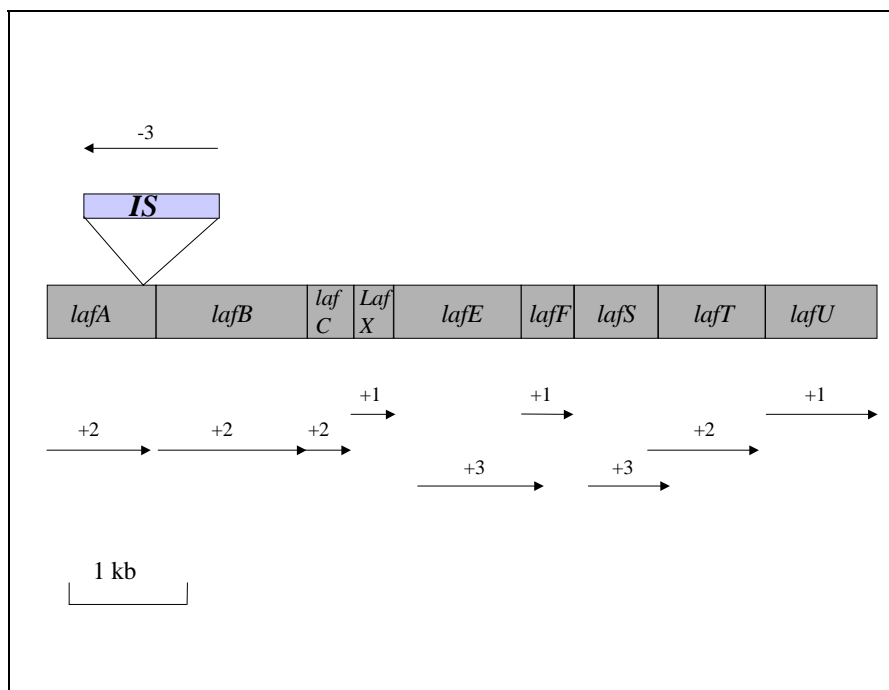


Figura 3.D.4 Organización genética del locus clonado de *A. salmonicida* A450. Las potenciales ORFs fueron llamadas como a sus homólogos en otras especies bacterianas; *IS*

corresponde a la transposasa inserida en *lafA*. Las flechas indican la dirección de transcripción y la pauta de lectura (+1, +2, +3, -3).

3.D.1.2.3 Secuencia completa y análisis de la misma

```

1   CCGCAGCTGT CTTAATATCC CCATTCCCGC TTTTTTGAGC ATGATCACTT
51  AATAAATTGT CGTCTCCGGC TCAATTTTCT CCATGCCCTG GTCGTCCCTG
101 CTATTTTGTC TATCTAACAA CCTGCAGTGC AGCGTCTAAA TTGAGGAAAT
151 AACCATGGGC TTGTCCATTC ATACCAGCTT TGCTTCCATG TCCACCCAGT
201 GCCAAGTGAA CTCGTCCAAC AAGATGCTGG GTACCACCAT GCAGCGTCTG
251 GGTACCGGTC TGCGCATCAA CTCCGCTGCC GACGATGCTG CCGGTCTGCA
301 AATCGTGATC CGTCTGCAGG CTCAGTCCAA CGGTCAAAAAG GTTGGTATGC
351 GCAACGCTCA GGACGCAATC TCCATGATCC AGACCGCTGA AGGCGCCATG
401 GACGAGATGA CCAACATCAC CCAGCGCATG AAGGATCTGG CTACCCAAGC
451 GGCCAATGGT ACCAACAGCA CCAAGGATCT TGATGCCATG GACGCCGAGT
501 TCAAGGAATT GGGTAAAGAG CTGGGTAACA TCCGCGACAA CACCACTTTC
551 GGCGGCACTT CTCTGCTGAA AACCGGTGGT AAATTCCAAG CTACCGGTGG
601 CGTGACTTTC CAAATTGGTG CCAGCGTTAA TGAGAAACTT GTTTTCGATG
651 CATCCACCAA AGTAACCAGC GTCAATACCG CTATCAGTAC TGCCTCTACT
701 GCCGCCCTGA CCACTGGTGC GGCTGCCCAG ATCACTGCCA TGGACAGCAT
751 GCTGGAGAAG ATCGGTGAAG CTCGTTCTGC CTTCCGTGCC AACATCAACC
801 GTCTGGAGCA TACCGTCAAC AACCTTTCCA ATATGAAAGA GAACACCGAT
851 ATGGCGAATG GTTGAATCGC CCCTGGTTTT CTAGACACTC TGTGCTGAC
901 AAATAAACTG CCTTTCAAAC TCTACCGGCG ACAGCCCATC ATTGGAACCA
951 TGGCGCCTGA TTGGGTTGTA AAACATTTTCG ATATAATCAA ATACGTCGCT
1001 GCGGGCTTCG TCTCTTGTCG AGTAAATCCT GCGCTTGATC CGTCCCCTT
1051 TGAGCAACTG AAAGAAGCTC TCGGCGACAG CATTGTCGTG GCAGTTACCA
1101 CGTCGGCTCA TACTGCAACT CAGGTTGTGG GCCTTCAGAA AGTCCTGCCA
1151 TTCACCACCG GTAAACTGGC TGCCCTGATC CGAATGCACC AGTACCGGCT
1201 GCGTTGGCTT ACGTCGCCAA ACCGCCATCA ATAACGCATC AACCGCCAAG
1251 CCTGCCGTCA TCGTGGCTT CATCGCCCAG CCGATGATCT GGCGAGAAAA
1301 CAGATCGAGC ACCACCGCCA GGTACAACCA CCCTTCTTGA GTTCGGATGT
1351 AGGTAATGTC AGTCACCCAG GAGATGTTGG GGGCTGGCAC CTTAAATTGA

```

1401 CGTGCCAGCG TGTTTGGGGC AGCCTGTGGG CTCTTGCCCTC CATAATGCCC
 1451 CTTACGGCGT TGATAGCCAG TTTGCGAACG CAGCCCCCTCC CGCCTCATTA
 1501 ATTTGGCCAC ACGGTGCTTG CCGCAGGCTT CCCCCAAGTC ACATAGATCG
 1551 CGATGGATCT TGCATAACC GTAGACAGCA CCAC'TTTCCA GCCAGGATTG
 1601 CTTGACCAAT CCGGTCAGCC GTTCATCCGC TTGCTGGCGT AACGATGCGG
 1651 GCTGTTTCAG CCACGCGTAG AAGCCACTTC GGTGAACCCC CAGGGTCTGG
 1701 CACAGGGTAA CGACACTGTA CCGGTCGAGT CGGGAGGTTA TGAACGCGTA
 1751 CCTTTCCTTG ACTCGCTGGC AAAGTACGCG GCGGCCCTCCT TTAATATGTT
 1801 GCAGCTCCTC AGTGACTTGG CGCAGTTCGG CTTTCAGACG GCGGATCTCG
 1851 GCTTGTAAGG CTGACTCTTC GTGCTGCTGA TCAGCGGGCT TACCGTACTG
 1901 CTTGAGCCAT GCATACAGGC TGTGGCTGGA TACCCCGAGG GCTCGTGCTA
 1951 CGTCAGCCAC CGGCCGGCCA CGCTCGGTAA TTTGTTTAAC CGCTTCGATT
 2001 TTGAATGTTT CTGGATAACG CTGACGGGTC ATAACACCTC CAATAGTTGC
 2051 CTCATTTTAA GGCTGTGAGG TGTCTAGGGA ACTGGGGGCG ATTCAAGTTCG
 2101 CATCATGGAT GCCGATTTTC CTCAGGAAAG CACCAATATG ACCAAGAACC
 2151 AGATGTTGAT GCAGGCTGGC ATGTCCGTTT TGTCCAACCT CAACCAGATG
 2201 ACCGGTATGG TAACTGGTCT GCTGCGT**TAA** TGGATTGCAT GGCCGCTCCC
 2251 GTGGGGCGGC CTTTGTCTGA TAAGGGTTTG TCGGTTGGAA AGAGTCGAAA
 2301 CGGTTTTTCC CAACAAGCAT GCCAGTTGAG TGAAATGAAG AGGGATTAAG
 2351 ATGCAAATAG ATCCGGCCAG CACAGCAATG CAACTGGTAG CTATCGAACG
 2401 CAAGAACATG GATGCACTGC TGAATAAGCA GATGGATGGC ATCAAAGGTC
 2451 AGCAGAGTGC GCTCAGCACG CTCAATACCA AGCTGTCGAC TTTCCAGACC
 2501 ATGCTCAAAG ATCTCAATAA GGCATCCAAT TTACAGGCGC AGAAGGCGAC
 2551 CATGTCCCAG GACGGGGTCA TGACGGTGAC GAGTAACGGC AAGGCCAGCT
 2601 CGGGGCAGTA CAATTTCTTT GTGGAGCAGC TTGCCCAGTC CCATCAGATC
 2651 GGTCTCAGCC TGGATAGTGA AACGGCCCCC CTACCTGCAG ATGGTGTCTT
 2701 CTCGCTCACC GTCAAGGGGA AGACCATCGA CATCGATCTG GCCACATTGC
 2751 CGGCAGGCTC AACCGTCAAG GATCTGGTCT CCCACATCAA CGATGCCAAG
 2801 GACAATCCCG GCGTCAAGGC GACCCTGGTC CGAACCGACG GCAAAGTCAA
 2851 CATGGTGCTT ACCAGCAAGG ATAGCGGGTT GGAGAATGCC ATCGTGGTCA

2901 ATTACCGCGG GGATGCGAGC AATTCACCTGG GAGCAGCGAT AAGCGGCAAG
2951 ACAGACATCA CCAAAGCTCA AGATGCCAAG TTGCGGATGG GGGGGGACAA
3001 TCCGTTGACC ATCACCTCTG CCAGCAACAA GATTGAAAAT GTGGTTGATG
3051 GTCTGACGCT GCAGCTGACC AAGGCTCAGA AGAACGGTGA TGCTCCCTTG
3101 CTGGTAAACA TAGAGCAGGA CAAGGAGGCC GTGACCGGCT CGCTCAAGAA
3151 GTTTGTGCGAC AGCTACAACG AACTGATCGA TGAGCTGGCC AAGATGACCT
3201 CCAGCGATCC CAAGGCTCCT GGTGCGCTTT CTTCCGACAG CGGGGTACGC
3251 AGCCTCAAGA GCGTACTTTC TAACAGTGTG CGTGACCTGC CCAATGGCCT
3301 GAGTCTCAGC AGTCTCGGGA TCAAGACCGA CAAGGCAGGC AAGCTCTCTT
3351 TCAGTGAAAC GGATTTCAAC AAGGCGTTGG AGAAGGACCC CGAGTTACTT
3401 GGCAAGGCGC TGATGGGGGA TGATGGTCTG CTCAAACGGA TGAGTGACTC
3451 ACTGGATCCT TATACCAAAC GCGATGGTGC TTTGAAGGGG CGCAAGAGCG
3501 GATTGGAGGC CAGTGAAAAG CGTGTAATG AGCGAATGGA AGCACTGGAT
3551 CGTCGTATGG ATTCCGCGTA TAAGCGCTAT CTCAACCAGT TCACCACCAT
3601 GAACCAGATG CTGCAGACAA TGGGCTCACT **CTAAGCCAGA** GTCAGCCCCA
3651 CCATCCGCTG CGTCTTATCC CGAACAAGCG AGTTGTACAT GTTTGAACAC
3701 CAAGATGGTT ACGATGCCTA TCAGTTTGCT GCTACTCAGG CCAAGGCAGC
3751 CAGTGCCGAT CCACATCAGC TGGTGCTGAT GCTGATTGAT GGTCTGCTTG
3801 ATGAGATGGC CAGGGCGGAA GGCCATATTC TTGCCAAGCA ATTTGAGCGT
3851 AAAGGGCAGA CTATCAACAA ATGCCTGCAA ATCCTGGGGG GACTTGATAG
3901 CGCTCTGGAC ATGGAGAAGG GCGGGGAGCT TGCAGCCAAC CTGCATCGCC
3951 TTTACGACTA CTGTGGTCAG CGTTTGTTTG AGATCAGTGT ATCCAACGAT
4001 GTCGCCGGGT TTGCCGAGGT TCGTTGTATT CTGCTGGAAT TGAAGGAAGG
4051 TTGGGAAGCG ATGGCGCAGC ATCCTCGCTA **ATGCGGAAGT** TATCCTTCCC
4101 CTGTTTCAAC TCGATACCAC AGCCATTATC TGAAATTCCT CAATTCCATA
4151 TCTGGCCTGC TCCTTGCTAG TCGGTAAGGT CATCTTAATT AGGGGCCATT
4201 ATCATGTCTGA TGACCGGGTC TAAGCCGCTC AGCACAGAAC TAGAGACTCG
4251 CCAGCGTCAG CTGTTGGGGC TGGGTCGCCT GATATTGCAA CAGGCGCGTG
4301 CTGGTCAATG GGACGCTGTG CGTCTGACCG ATAGCCGGCT GGCTCAATTC
4351 ATTCAACACA TGCTCAAGCA ACCGGACTTG TGGTCATCAT TAGAACCAGC
4401 CCGGGCACAG GTACGCAACT GGCAACAGGA GGCCCTGTTG TTATGTCAGC

4451 AAGAAACGGC ACTGCGTGAG CAGGAATGGC ACGATCTGTC TCGGAAACGC
 4501 GAGGGCTTAC AGGCTTATGG TGAGGTACAA GAATGGGCAT GATCCAGTTT
 4551 GCCGGTGTCG ACAGCGTAGC TAACCTCGAA TCGACCGGGT TCAACCGCCT
 4601 TGCCCGTCAG CCTGATGAGC AGGGCGAAAT GTACCAACCC CTGGATCTCC
 4651 TGTTTACAGA AGAACTCACT ACGCTGCCAG CAGAGGTTGC TGACGACGCT
 4701 GATGTTGGCA CTGATGTGGT TGATACGGTT CCAGAAGATG CGACTGAACA
 4751 ATTGGAATCC TTCACCAACA TGCCACCCAT GTTCATCCTG AATGATGAAG
 4801 CCGCGAGTCT ATCATCTGCA CGACTTGCTC AGCCTGATGT GGAGATGAAT
 4851 AGCGGGAAGG AGGGAGGAGC CGTTCAAGAT CGTGCCCCCT CCATATCGGT
 4901 GGCATTGCGT TCGTTGTCGG TCTATGGGCG GTCGGAGACG GAACGGCCAC
 4951 ATATTGTTGA ACAGACCACG TTGGGCAAGG ATAAACCTGC GTTCTCCGTG
 5001 ACCGATTTTT CACGAATGAT GGTGGGGCAG CAAGCAGCCC AGACTGGCGA
 5051 CTTGCCATTA CGCGACAAGC TGATAGCAAG TTTGCAACCC TTGCTGGGTG
 5101 GCAAGGTTCC ATTCGAGCTT GATTCTGGTG TGCCTGAGCT CAAGGGGGGG
 5151 ATGGGAAACC TCTTGTATC GCCTCTTTCC AGGCCGTCAG AGTATCAATG
 5201 GGCCCCCGCC AAGTTGGCCG ATAATCCTGC GCATTGGGGC CAGCAACTGG
 5251 TCGACGTATT GAAGGACAAG GTTGAGCTCC AGGTCAATCA ACAGATCAAG
 5301 CAAGCACATA TCCGTCTTGA CCCGCCTGAG CTGGGGCGGC TTGAACTGAC
 5351 AGTTCGGGTC GATGGGGACC GTCTCAACGT TCAACTCAAT GTAACCAATC
 5401 CCGCTGTCGA AGATGCGTTG ATCCAGTCAA TGGAGCAACT GCGAATGAGT
 5451 TTGGCCCCC ATCATGTTGG TGGTGTGAG GTCAATGTTG GTCAGGGAGG
 5501 TGAGCAGGGG CAGCAGGAAA AATGGCAGCA ACAGCAAATT ATGGCCGGCA
 5551 GGCGGCAGTG GCAAGAGGAT ATCGAGCCAA CTGACAGCAC TATGCGGGAT
 5601 TGGTTGAATA CCCTGGTCTG **AT**TTTTTATTA TCCGGCAATA GCAAGAGTGA
 5651 TTTCATATAT GCGGCGTGTC ATGAAAGTGGT TGATGGTGGT CGTGATGGCC
 5701 CTGTGTCTAT TAGCCGTGCT GGCCTATGGC ATTTATCTGA AGCGTGATTT
 5751 GGTCGCCGTG TGGCTGGGGC TGGCCGAACC CAAGCCAGAG TTGAGTGCGA
 5801 CTCCATTGTT CAAACCGATG GAGCGCTTTG TCATCAGTTT GGAAGGGGGC
 5851 GCAGAGTCCC ATTATCTCGT GCTGGAATTG GCTCTGGTTA CTCATAATCC
 5901 GGCACAACCT AATACCCTCA ATGAGCTGAC TCCGCTCATC CGCAATGCGA

5951 TGGTGCAGTA TTTCAGTCAT CGCACACACG ATGATGTGAA AAAAGAGTTG
 6001 CAGAACATCA CGGCATTGCA AAGCTCTCTG CTCGGCAAAC TGGTTACGAC
 6051 ACTACAGGGC TATGGGTACA AAACCTATCT GGATGAAGTG TTGATCACCA
 6101 AGGTATTGGT GCAAT**TA**ACAA CGACATGATG GATGCCGATT GGGATACACC
 6151 GCCTGAGTTT ACCCATTCGC CCCCTCGCAC GGGTGAGCAG GGCAATATTG
 6201 ACTCGTTATT TGCCGTTAGT GAAACGGGCT GCCAGCCACC TGCGCAGCCA
 6251 GGTTTCTGCC TGCTTCGATC AGGAGGATAT GGAGCAGGTT GGCATGATGG
 6301 GGTTGCTGGA GGCCTGGCGT CGTTATGATA GTGAACCGGA CCCCCAATTT
 6351 GAAAGCTACG CCTTCAAGCG TATCCGTGGA GCCATGCTTG ATGAGCTTCG
 6401 GCGTCTGGAT TGGCGGCCCC GTCAACTACG CCAGCAGGTG CACAGCCACA
 6451 ATCAAGCCCA GCGAGAACTG TATAACCGTT TGGGACGAGC TCCGACTGAG
 6501 CAGGAACTGG CTGTATCTCT GAATTGTACC GTGGAGGAAG TGCGACAACT
 6551 GGCATATGCC AGTCAAGCCG AAGCGTTACA GAGTCTGGAA GAGTGGCTGG
 6601 AGAATGGAGG CAAGGCGCCG GCCACTGAGT CTGATGATGT CGATATGGCC
 6651 ATGACCATCA GCAAGGTTCT CACCTCATTG GACAAGCGGG AGCAACTGCT
 6701 GCTCTCACTC TATTACCAGC AAGAGTTGAA TATGAAAGAG ATCGCGCTGG
 6751 TGTTGGGCCT GACTGAATCA CGTGTCTGCC AATTGCACAA ACAGTGCGTC
 6801 CTTCAGCTCA AGCAGCGTTT GGTGACTCC ATATAT**TAAT** GCTTCACCAC
 6851 TTGTGGTGGA GCTCCTTGAA TTCTGCGGGA GCGTTCATGC AAAAAACAGAT
 6901 AGGTCTTGGC GTCATTTTCA TTTGTGTACT GGGTGGTTTC ATGATGGCAG
 6951 GCGGCAAACC GATCGCCTTG TGGCAGCCAG CCGAGCTGAT CATCATCATA
 7001 GGTGCTGCGG TCGGCTCCAT GTTTCTTGGT AACTCGAAAG AGGTGATGCA
 7051 TGAGATGTGG CGCCAGATGA AGCAGTGCTT CAAATCCAAC AAGGATGAAA
 7101 AAGAGATCTA CCGCGAGCTG CTGACCCTGA TGCACCAATT GCTGGAGGAG
 7151 ACTCGCAATA AGGGCATGAA GGCACCTGAT GAGCACATCG AAAACCCGCA
 7201 ACAAAGCTCA GTATTTTTGA TGTACCCCCA GATATCGGAA GATCCTCAAC
 7251 TGCTCGGTTT CATCATTGAT AACTTGCGTT TACTGGGAAT GGGCAAGATT
 7301 ACGCCCCATG AGCTGGATAC CATGCTGGAA CAGGAGATCA TGGCCATCGA
 7351 AGAGGACATG CTCAAACCGG CACATGCCCT GCACAAGGCC GGTGAGGCTT
 7401 GCCCGGGTTT CGGTATTCTG GCTGCGGTGA TGGGGATCAT CATTACCATG
 7451 CAGCAGTTGG ATGGCCCCCT GAGCAATATC GGTGTGCATG TAGCTGCCGC

7501 GTTAGTGGGA ACCTTCATTG GCATCTTCCT TTGTTACTGC TTGCTGGAGC
 7551 CCATCAGCAA TGCCATGGAA GAGATGGTCA AGCGTCGGAT CGGACTGCTG
 7601 ATGTGTATCA AATCTATTTT GATTGCCCAG CTTCGTGGCA AAACCCCGCT
 7651 TATCTCGGTC GACTCGGGTC GCAAGATGCT GGAGCCTGAC GTTAAACCCA
 7701 GCTTCCTTGA ATTGGAAGAA TGGGTGACGA ACAGGGCCAT GTAATGCGTA
 7751 ACCACGAACA GATCATCATC AAACGCCAGC AACGGCGCAG CAGTGCCCCCT
 7801 AAAGGTGGTG GAGCCTGGAA AGTGGCTTTT GCCGACTTCA CTTTGCGCAT
 7851 GATGGCATT TTTATGGTGT TATGGATCCT GGCGGTTTCC AGCCAGGAGG
 7901 AGCGTGAAGC GGTGGCCAGT CGTTTACGTG ACTACAGCAT CATGGACAGT
 7951 GAAGCGAACC CGTTCGATAT CAGCAATAGT CCCTACCCGG TGGATCTGGG
 8001 AGGAAACCCA TCCGTACTAG AAGAGCTCAG TCCCAAGTTT GTAGAAGAAG
 8051 GGCAGCGGAT GCCGAAGCAT ATGGAGCGAA ATCGCAGCAT CTTTTCTGAC
 8101 GGAGTCAGCG GAGGTTACGA GAACCTGCTG GTGGGGAAAA TTGAAGGTGA
 8151 GGCGCAGATG AAGCAACTGG CCGGGTTCAT TGGCTCGTTG GCGGATCAGA
 8201 TGCAAGCCAA AAACAACCTT GAGCTGCAAT TGGTACCACA AGGTTTGAGG
 8251 ATTCTCATTC GTGATGATGA TGAGCGCGAG ATGTACAGTC GTGGGAGCGC
 8301 ACGGATCAGC CCCTTTTTCG GGCATATGCT GATGGCGTTG GCGCCCATAT
 8351 TTCAGCGAGT TGAGAACCGC GTCATGATCT CGGGCCACAC CGATAGTACC
 8401 CCTTTTGCGG GTGACAACTA TAGCAACTGG GAGCTTTCGT CCGATCGCGC
 8451 CATGATGGCA AGGCGGGTCT TGCTTGCCGG AGGCATGCCC CCCGAGCGGG
 8501 TGGGGCAGGT TGTGGCCATG TCAGATACCA TGCTTGAAAA TACAGCTGAT
 8551 CCACGAGGCA GCGAAAACCG CCGCATCGAA CTGTTGGTAA TGACAAGTCA
 8601 GGCGGAAAAA AATCTGGAAC AGTTATTCAG CGCGCAAACCT CAAGCCGCGG
 8651 TGAAACAAGC CAAGGACGAC ACTTCTCATG GAAAACCT**TG** **AA**ATGGATCT
 8701 GTCTGGATCA GATGCGCTGA GCGATCCTCG GCGTAAGGTC CCCCGCTGGT
 8751 ATTTACATGA TGGCAGTACT CCGCTGGAGT CACAAAGCTG CGGTATTGCT
 8801 GCACGTCTTA TGGTGTCTGG TCTTCTGTTT GATAAGAGCA TCGGTAGGGC
 8851 CGTGATCAAG GATATAGGGC CAGGGGGCGT TGGTTTTCTG GCTCCTGCGC
 8901 GTTTTATCTT GCCCGAAATT GTCAGTCTGT CGCTCTCCCC GCGTATTGTA
 8951 CTTGATTGCC AGATAACTCA TCGGCGCTCA ATTGGCCAAT ATCTGAGCTT

9001 TTATGGTGCC CGTTGGTCAG ATCCAGAATC AGTAGACTTG TCGCCAGTGC
 9051 TTAGCCATTG GCGACATTGC TTCATGGTGT CAGGAGGGGT CGCTTCGTCT
 9101 CCAGTCCCAG TGGATCC

Figura 3.D.5 Secuencia nucleotídica completa del locus *laf* de *A. salmonicida*. Los codones de inicio y parada de las diferentes pautas de lectura abierta se han marcado subrayando y en negrita respectivamente; se encuentran en cursiva aquellos pertenecientes a la transposasa. El putativo promotor está también subrayado delante de *lafA*. El inicio de transcripción sería el nucleótido marcado con la letra más grande.

| ORF | Posición | %G+C | Proteína codificada | | pI ^a | GRAVY ^b |
|--------------------|-------------------|-----------|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| | | | aa | KDa ^a | | |
| ORF-1 ^d | 155-865/2105-2230 | 64,6/69,0 | - | - | - | - |
| ORF-2 | c881-2032 | 62,2 | 383 | 44,282 | 9,94 | -0,588 |
| ORF-3 | 2351-3634 | 69,2 | 427 | 45,765 | 7,70 | -0,412 |
| ORF-4 | 3689-4081 | 55,0 | 130 | 14,481 | 4,98 | -0,205 |
| ORF-5 | 4210-4542 | 56,8 | 110 | 12,851 | 6,73 | -0,730 |
| ORF-6 | 4539-5621 | 57,3 | 360 | 39,551 | 4,47 | -0,445 |
| ORF-7 | 5671-6117 | 62,4 | 148 | 16,654 | 6,90 | -0,344 |
| ORF-8 | 6132-6839 | 61,0 | 235 | 27,193 | 6,97 | -0,427 |
| ORF-9 | 6839-7744 | 66,9 | 301 | 33,617 | 5,74 | -0,234 |
| ORF-10 | 77448691 | 60,8 | 315 | 35,259 | 5,85 | -0432 |

Tabla 3.D.1 Principales características de las 10 ORF localizadas en la secuencia nucleotídica y su ubicación en la misma.

a: Punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína calculado usando el programa ProtParam de Expasy

b: Promedio de hidrofobicidad de la proteína usando el método descrito por Kyte y Doolittle (Kyte and Doolittle 1982)

c: secuencia complementaria.

d: Esta ORF se encuentra en la secuencia seccionada en dos ORFs parciales por la interrupción de la transposasa, cuyos codones de inicio y parada se encuentran en las bases señaladas.

3.D.1.3 Complementación de mutantes *laf* de *Aeromonas* mesófilas

3.D.1.3.1 Construcción de diferentes plásmidos

Para realizar los ensayos de complementación sobre diferentes mutantes *laf* de *Aeromonas* mesófilas, se diseñaron 4 plásmidos que contuviesen los cuatro genes salvajes de *A. salmonicida* A450, *lafA* con la transposasa incluida, *lafB*, *lafS* y *lafT* respectivamente. Para ello se utilizaron las parejas de cebadores SLAF1-LAFAD, SLAF3-SLAF4, SLAF5-SLAF6 y SLAF7-SLAF8 con las cuales se realizaron las respectivas reacciones de PCR con el ADN de A450 como molde. Dichas reacciones se llevaron a cabo a las temperaturas de hibridación ADN/cebador de 58°C en todos los casos excepto con la pareja SLAF5-SLAF6 que fue de 56°C, y con un tiempo de extensión de 2 minutos 20 segundos, 1 minuto 30 segundos, un minuto y un minuto 15 segundos respectivamente para amplificar en cada uno de los casos bandas simples de 2388 pb, 1522 pb, 906 pb y 1256 pb en cada una de las reacciones.

Cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos se ligó de manera independiente al vector pGEMT easy y se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α , seleccionando las colonias resistentes a ampicilina y azules, producidas por la adición a la placa de X-Gal e IPTG y que indicaban las colonias que contenían el plásmido con el inserto ligado. Los plásmidos que cargaban cada uno de los genes *lafA*, *lafB* y *lafS* fueron digeridos con la endonucleasa *EcoRI* para ligar dichos genes a la misma diana de restricción del vector pACYC184 previamente defosforilada; se transformó cada uno de ellos en *E. coli* DH5 α y se seleccionaron por resistencia a tetraciclina los plásmidos pINA1, pINA2 y pINA3. En el caso de vector pGEMT easy con el gen *lafT*, éste se liberó mediante la digestión con *NotI*, para ligar de nuevo al vector pACYC184 digerido en este caso con *EagI* y también previamente defosforilado. Se transformó nuevamente mediante electroporación en *E. coli* DH5 α y se seleccionó, en este caso por resistencia a cloranfenicol, el plásmido pINA4.

3.D.1.3.2 Transformación de los mutantes mediante conjugación

Se emplearon para los ensayos de complementación los mutantes obtenidos en la sección B de este trabajo, AH-1982 (*lafB*), AH-1983 (*lafS*) de *A. hydrophila* y AAR9 (*lafB*), AAR6 (*lafA1lafA2*) de *A. caviae*, que producen todos ellos flagelo polar pero en ningún caso el lateral. Así mismo se empleó el mutante AH-1984 (*lafT*) de *A. hydrophila* que a pesar de producir los dos tipos de flagelo carecía de movilidad.

Mediante conjugación triparental se transformaron los dos mutantes *lafB* con el plásmido pINA2, el mutante en *lafS* con pINA3, el mutante en *lafT* con pINA4 y por último el mutante en las dos flagelinas *lafA1/lafA2* con el plásmido pINA1. Así mismo se conjugaron cada uno de los mutantes con el vector pACYC184 sin inserto. En todos los casos se seleccionaron los transconjugantes por resistencia a los antibióticos adecuados.

3.D.1.3.3 Ensayos fenotípicos de los transconjugantes

3.D.1.3.3.1 Microscopía electrónica

Se realizaron preparaciones para microscopía electrónica de transmisión a partir de crecimientos en placa de los mutantes transformados, encontrando que el plásmido pINA1 no complementaba la mutación del mutante AAR6, que continuaba por lo tanto sin producir flagelación lateral, mientras que la expresión de flagelos laterales era completamente restablecida en los mutantes AAR9 y AH-1982 cargando ambos el plásmido pINA2. Así mismo, el mutante AH-1983 recuperaba el fenotipo salvaje al complementarse con el plásmido pINA3.

Ninguna de estas complementaciones se observaba en los mismos mutantes con pACYC184 en su interior.

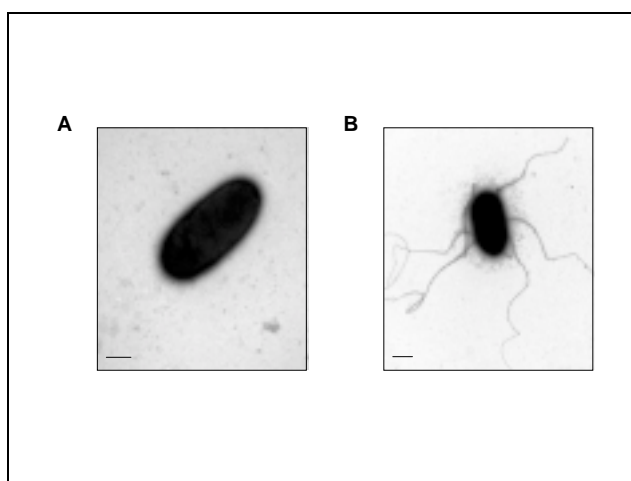


Figura 3.D.6 Microscopía electrónica de transmisión de *A. hydrophila* AH-1982 con el plásmido pACYC184 como control (A) y el plásmido pINA2 (B). Barra: 0,5 : m

3.D.1.3.3.2 Movilidad

El plásmido pINA4, con la copia salvaje del gen *lafT* de *A. salmonicida* en su interior, complementaba la falta de movilidad del mutante AH-1984, tanto en medio líquido como en placa y a diferencia del plásmido pACYC184 introducido en el mismo mutante o del propio mutante de *A. hydrophila*.

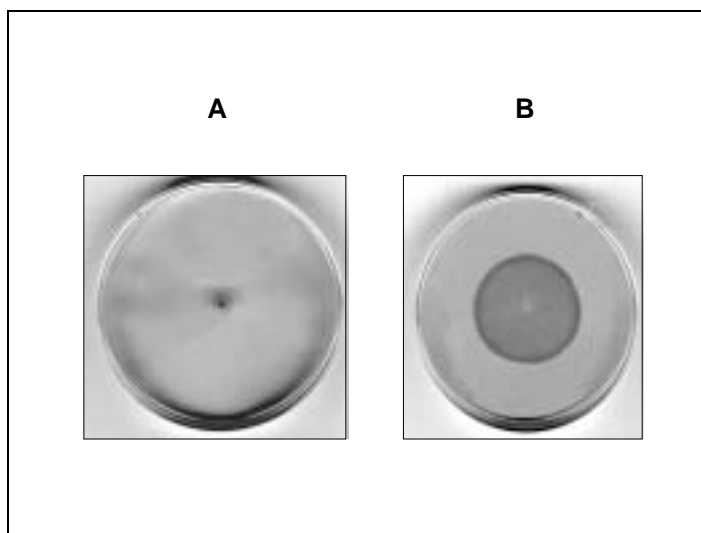


Figura 3.D.7 Crecimientos sobre placas de movilidad de *A. hydrophila* AH-1982 con el plásmido pACYC184 como control (A) y el plásmido pINA2 (B).

3.D.1.3.3.3 Ensayos de adhesión y formación de biofilm

Para comprobar la funcionalidad de los genes *laf* de *A. salmonicida* sobre el proceso de adhesión a células eucariotas, así como en la habilidad para la formación de biofilms, tal y como ya ha quedado demostrado en *Aeromonas* mesófilas, se procedió a realizar ensayos de adhesión sobre células epiteliales HEp-2 así como análisis para la formación de biofilms *in vitro* de los mutantes y de estos mismos complementados.

Los mutantes de *A. hydrophila* AH-1982 y AH-1983 así como los dos de *A. caviae* AAR6 y AAR9 mostraban un 85% de reducción en la capacidad de adhesión, además de presentar una drástica disminución en la habilidad para formar biofilms. El mutante de *A. hydrophila* AH-1984 presentaba un 50% de reducción en la adhesión a células HEp-2 frente al control y también cierta reducción en la formación de biofilms *in vitro*. Tras la complementación de los mutantes, se obtuvieron resultados coherentes con los anteriores de microscopía electrónica y movilidad, por lo que el mutante AAR6 no mostraba diferencias con o sin el plásmido pINA1 en su interior, del mismo modo que el resto de mutantes conteniendo pACYC184. Sin embargo, los cuatro mutantes AH-1982, AH-1983, AH-1984 y AAR9 alcanzaban los valores de sus respectivas cepas parentales al ser complementados con los plásmidos que llevaban la copia salvaje de *A. salmonicida* correspondiente a los genes mutados en cada uno de ellos.

| Cepa | Nºmedio bacterias/Célula HEp- 2 ± SD ^a | Habilidad para la formación de biofilm OD ₅₇₀ ± SD ^a |
|----------------------------|--|---|
| AH-3 (salvaje) | 18,3 ± 1,3 | 1,1 ± 0,2 |
| AH-1982 (<i>lafB</i>) | 2,7 ± 0,8 (15) | 0,4 ± 0,1 (36) |
| AH-1983 (<i>lafS</i>) | 2,8 ± 0,7 (16) | 0,4 ± 0,1 (36) |
| AH-1984 (<i>lafT</i>) | 9,2 ± 1,3 (51) | 0,7 ± 0,1 (63) |
| AH-1982 + pINA2 | 18,0 ± 1,1 | 1,1 ± 0,1 |
| AH-1983 + pINA3 | 17,4 ± 2,0 | 1,1 ± 0,2 |
| AH-1984 + pINA4 | 18,7 ± 1,4 | 1,1 ± 0,1 |
| Sch3N (salvaje) | 39,1 ± 4,8 | 1,5 ± 0,2 |
| AAR6 (<i>lafA1lafA2</i>) | 5,5 ± 2,7 (14) | 0,6 ± 0,1 (40) |
| AAR9 (<i>lafB</i>) | 6,3 ± 1,7 (16) | 0,6 ± 0,1 (40) |
| AAR6 + pINA1 | 5,6 ± 2,2 (14) | 0,6 ± 0,1 (40) |
| AAR9 + pINA2 | 37,9 ± 3,6 | 1,4 ± 0,2 |

Tabla 3.D.2 Adhesión a células epiteliales HEp-2 y formación de biofilms *in vitro* de diferentes *Aeromonas* mesófilas salvajes y sus mutantes.

a Los números representan el número medio de adhesión obtenido ± la desviación estándar. Los valores se obtuvieron de al menos tres experimentos independientes ($P < 0,0005$).

Los valores entre paréntesis son porcentajes respecto a los controles.

3.D.2 Discusión

Tradicionalmente el género *Aeromonas* se ha dividido en base a la movilidad, siendo la especie *A. salmonicida* típicamente inmóvil. Sin embargo, McIntosh y Austin, (1991) mostraron algunos aislados de *A. salmonicida* capaces de producir flagelación polar sin vaina a temperaturas de incubación supraóptimas y en presencia de un 18% de Ficoll. Aun en las condiciones dadas, dicha flagelación se presentaba únicamente en un 1% de la población, y a diferencia de otras condiciones de cultivo donde *A. salmonicida* era incapaz de expresar flagelo. Existen también evidencias genéticas de que algunas cepas de *A. salmonicida* producen flagelo, ya que dos genes que codifican para las flagelinas polares *flaA* y *flaB* han sido identificados y caracterizados (Umelo y Trust, 1997).

Como en *Vibrio parahaemolyticus*, hay dos tipos de flagelación responsables de la movilidad de *Aeromonas* mesófilas, tal y como indicamos en otras secciones de este

trabajo; un único flagelo polar sin vaina que se expresa de forma constitutiva y permite a la bacteria nadar en medio líquido, y un segundo tipo de flagelación, también sin vaina y distribuida en la célula de manera peritrica, que además sólo se expresa en aquellos medios donde el flagelo polar es incapaz de propulsar a la bacteria (Gavín y col., 2002). En un estudio reciente sobre el flagelo lateral y la movilidad mediante “swarming” de diferentes especies de *Aeromonas*, cuatro aislados de *A. salmonicida* reaccionan positivamente con una sonda de ADN específica para los genes de flagelina lateral (Kirov y col., 2002). Dicha sonda se utiliza en ese mismo estudio para correlacionar aquellas cepas de *Aeromonas* mesófilas que producen “swarming” con una hibridación positiva. En este trabajo hemos demostrado que al menos en las 50 cepas de *A. salmonicida* estudiadas, los genes del locus *laf* están presentes, además de haber secuenciado el mismo locus en la cepa A450.

Demostramos además, mediante complementación de mutantes de *Aeromonas* mesófilas generados en la sección B de este trabajo, que los genes *lafB* y *lafU* de *A. salmonicida* son completamente funcionales, basándonos en algunos caracteres fenotípicos como presencia o ausencia de flagelación lateral y movilidad mediante “swarming” o bien por la habilidad de las bacterias de adherirse a células HEP-2 y/o de formar biofilms *in vitro*. En estos ensayos de complementación concluimos además que el único gen de *A. salmonicida* que no presenta funcionalidad es *lafA*, ya que en todos los aislados de la especie que se han empleado para el estudio, se encuentra la misma putativa transposasa-8 de la familia IS3 inserida en medio del gen. El gen *lafA* de *A. salmonicida* se encuentra en el locus como un único gen de flagelina al igual que en *A. hydrophila* AH-3 y a diferencia de *A. caviae* Sch3N, con lo cual su inactivación incapacita la posibilidad de expresar flagelina.

Se intentó repetidamente introducir el cósmido pCOS-LAF, que contiene los 9 genes del locus *laf* de *A. hydrophila* (Gavín y col., 2002) en *A. salmonicida*, pero a pesar de que el vector pLA2917 sin inserto entraba y se replicaba en las cepas de *A. salmonicida*, no lo logramos con pCOS-LAF. Del mismo modo fue imposible introducir el gen *lafA* de AH-3 ligado en diferentes plásmidos, por lo que no tuvimos ninguna posibilidad para provocar la formación de flagelación lateral en *A. salmonicida* (no se muestran los resultados). La inactivación de *lafA* explica la imposibilidad de *A. salmonicida* de producir flagelación lateral, aunque probablemente esta especie tenga afectados otros genes para la síntesis global de flagelo (polar y lateral), razón que explicaría la falta de flagelación general de la especie. Resulta tentador especular que la incubación a temperaturas supraóptimas y en condiciones de alta osmolaridad (Ficoll) pudiese imposibilitar el correcto posicionamiento de la transposasa en *lafA* de *A.*

salmonicida, permitiendo que un pequeño porcentaje de la población produjese flagelo lateral en estas condiciones, lo que sería similar al crecimiento en medio sólido o semisólido.

La producción de flagelación lateral en *Aeromonas* mesófilas es un factor de patogenicidad, tal y como demostramos en las secciones B y C de este trabajo, ya que potencia la adhesión a células eucariotas o la formación de biofilms, ambas propiedades consideradas factores de colonización. *A. salmonicida* es una especie patógena, concretamente para los salmónidos, pero parece que el flagelo lateral como factor de patogenicidad está abolido en estas cepas, a pesar de contener los genes para su formación. Posiblemente otros factores de patogenicidad, como la formación de lámina A entre otros, son suficientes para establecer una buena colonización que promueva la infección y enfermedad causada por estas cepas. Este sería por tanto el primer caso bien documentado genéticamente donde un carácter patogénico (expresión de flagelo lateral) se suprime en un patógeno que posee una alta especialización debido a su reducido espectro de huéspedes.

- El flagelo y/o el antígeno O del LPS son estructuras de superficie de *Aeromonas* mesófilas involucradas en la adhesión a células epiteliales humanas.
- *flmA* y *flmB* son genes altamente distribuidos en *Aeromonas* mesófilas relacionados con el ensamblaje del flagelo y por lo tanto con el mecanismo de adhesión.
- En *A. caviae* Sch3N, los genes *flmA* y *flmB* se localizan en un putativo operón junto con *neuA*, *flmD* y *neuB*. Estos genes presentan una función en la biosíntesis del antígeno O del LPS y otra en el ensamblaje del flagelo.
- Los flagelos laterales son estructuras de superficie inducibles de *Aeromonas* mesófilas y están involucradas en la adhesión e invasión a células epiteliales humanas, así como en la formación de biofilms *in vitro*, siendo por lo tanto factores de patogenicidad del género.
- Tanto *A. hydrophila* AH-3 como *A. caviae* Sch3N poseen flagelinas laterales glicosiladas y diferentes de las polares.
- Las proteínas del motor de los sistemas flagelares lateral y polar respectivamente parecen ser las mismas en *Aeromonas* mesófilas.
- Las flagelinas laterales de *Aeromonas*, una o, menos frecuentemente dos, según la especie, se encuentran en un 60% de la población, situadas en el locus *laf* junto con otros genes del sistema de flagelación lateral, suficientes para inducir la expresión del flagelo lateral peritrico.
- Diseño de un método mediante PCR para determinar la presencia/ausencia de flagelina lateral en el género, que además muestra una clara correlación con la producción de flagelina lateral y/o la capacidad de moverse mediante “swarming”, ambos factores de patogenicidad de *Aeromonas* mesófilas.
- Aunque la especie inmóvil y psicrófila *A. salmonicida* posee los 9 genes del locus *laf* no produce flagelación lateral por la inserción de una putativa transposasa en su único gen que codifica para la flagelina lateral, siendo un caso bien documentado genéticamente de la abolición de un carácter patogénico en un patógeno altamente especializado.

- Aguilar A., S. Merino, X. Rubires, J. Tomás. 1997.** Influence of osmolarity on lipopolysaccharide and virulence of *Aeromonas hydrophila* serotype O:34 strains grown at 37°C. *Infect. Immun.* **65**: 1245-1250
- Aguilar, A., S. Merino, M. M. Noguerras, M. Regué, J. M. Tomas. 1999.** Two genes from the capsule of *Aeromonas hydrophila* (serogroup O:34) confer serum resistance to *Escherichia coli* K12 strains. *Res. Microbiol.* **150**:395-402.
- Aizawa, S. I. 2001.** Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Micobiol. Lett.* **202**: 157-164.
- Alexandre, G., R. Rohr, R. Bally. 1999.** A phase variant of *Azospirillum lipoferum* lacks a polar flagellum and constitutively expresses mechanosensing lateral flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4701-4704.
- Allen L. N., R.S. Hanson. 1985.** Construction of broad host-range cosmid cloning vector: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol. *J. Bacteriol.* **161**: 955-962.
- Allison, C., N. Coleman, P. L. Jones, C. Hughes. 1992.** The ability of *Proteus mirabilis* to invade human urothelial cells is coupled to motility and swarming differentiation. *Infect. Immun.* **60**: 4740-4746.
- Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers , D. Lipman. 1990.** Basic local alignment search tool. *J. Bacteriol.* **215**: 403-410.
- Altwegg, M., L. G. Martinetti, J. Luthy-Hottenstein, M. Rohrbach. 1991.** *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**: 44-45.
- Ames G.F.L., E.N. Spudich, H. Nikaido. 1974.** Protein composition of outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **161**: 955-962
- Anguita, J., L. B. Rodriguez Aparicio, G. Naharro. 1993.** Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2411-2417.
- Arora, S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, R. Ramphal. 1998.** The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**: 1000-1007
- Arora, S. K., N. Dasgupta, S. Lory, R. Ramphal. 2000.** Identification of two distinct types of flagellar cap proteins FliD in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **68**: 1474-1479
- Atkinson, H. M., D. Adamns, R. S. Savvas, T. J. Trust. 1987.** *Aeromonas* adhesins antigens. *Experientia.* **43**: 372-374.
- Atsumi, T., L. McCarter, Y. Imae. 1992.** Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion motive forces. *Nature.* **355**: 182-184.

Barghouthi, S., R. Young, M. O. J. Olson, J. E. L. Arceneaux, L. V. Clem, B. R. Byers. 1989. Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. J. Bacteriol. **171**: 1811-1816.

Barghouthi, S., S. M. Payne, J. E. L. Arceneaux, B. R. Byers. 1991. Cloning, mutagenesis, and nucleotide sequence of a siderophore biosynthetic gene (*amoA*) from *Aeromonas hydrophila*. J. Bacteriol. **173**: 5121-5128.

Barnett, T. C., S. M. Kirov. 1999. The type IV *Aeromonas* pilus (Tap) gene cluster is widely conserved in *Aeromonas* species. Microb. Pathog. **26**:77-84.

Belas, M. R., R. R. Colwell. 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio* spp. J. Bacteriol. **151**: 1568-1580.

Belland, R.J., T. J. Trust. 1987. Cloning of the gene for the surface array protein of *Aeromonas salmonicida* and evidence linking loss of expression with genetic deletion. J. Bacteriol. **169**: 4086-4091.

Bennett, J. C. Q., C. Hughes. 2000. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. Trends in microbiology. 202 Vo. 8 n°5.

Birnboim, H. C., J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids. Res. **7**: 1513.

Bott, M., M. Meyer, P. Dimroth. 1995. Regulation of anaerobic citrate metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Microbiol. **18**:533-546.

Bult, C. J., O. White, G. J. Olsen, L. Zhou, R. D. Fleischmann, G. G. Sutton, J. A. Blake, L. M. FitzGerald, R. A. Clayton, J. D. Gocayne, A. R. Kerlavage, B. A. Dougherty, J. -F. Tomb, M. D. Adams, C. I. Reich, R. Overbeek, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. M. Merrick, A. Glodek, J. D. Scott, N. S. Geoghagen, J. F. Weidman, J. L. Fuhrmann, D. T. Nguyen, T. Utterback, J. M. Kelley, J. D. Peterson, P. W. Sadow, M. C. Hanna, M. D. Cotton, M. A. Hurst, K. M. Roberts, B. B. Kaine, M. Borodovsky, H. P. Klenk, C. M. Fraser, H. O. Smith, C. R. Woese, J. C. Venter. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. Science. **273**: 1058-1073.

Burke, V., J. Robinson, M. Gracey, D. Petersen, K. Partridge. 1984a. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. Appl. Environ. Microbiol. **49**:361-366.

Burke, V., M. Cooper, J. Robinson, M. Gracey, M. Lesmana, P. Echeverria, J. M. Janda. 1984b. Hemagglutination patterns of *Aeromonas* spp. in relation to biotype and source. J. Clin. Microbiol. **19**: 39-43.

Burnens, A. P., J. Stanley, R. Sack, P. Hunziker, I. Brodard, J. Nicolet. 1997. The flagellin N-methylase gene *fliB* and a adjacent serovar specific IS200 element in *Salmonella typhimurium*. Microbiology. **143**: 1539-1547.

- Burrows, L. L., R. V. Urbanic, J. S. Lam. 2000.** Functional conservation of the polysaccharide biosynthetic protein WbpM and its homologues in *Pseudomonas aeruginosa* and other medically significant bacteria. *Infect. Immun.* **68**: 931-936.
- Carnahan, A., M. Altewegg. 1996.** Taxonomy, p. 1-38. In B. Austin, M. Altewegg, P. J. Gosling, and S. Joseph (ed.), *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
- Carnahan, A.M., S. Behram, and S.W. Joseph. 1991.** AerokeyII: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2843-2849.
- Carrello, A., K. A. Silburn, J. R. Budden, B. J. Chang. 1988.** Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.* **26**: 19-27
- Cascón, A., J. Yugueros, A. Temprano, M. Sánchez, C. Hernanz, J. M. Luengo, G. Naharro. 2000.** A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **68**: 3233-3241.
- Chakraborty, T., B. Huhle, H. Bergbauer, V. Goebel. 1986.** Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **167**: 368-374.
- Chakraborty, T., M. A. Montenegro, S. C. Sanyal, R. Helmuth, E. Bulling, K. N. Timmis. 1984.** Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.* **46**: 435-441.
- Chakraborty, Y., A. Schmid, S. Notermans, R. Benz. 1990.** Aerolysin of *Aeromonas sobria*: evidence for formation of iron-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **58**: 2127-2132.
- Chang, A. C. Y., S. N. Cohen. 1978.** *J. Bacteriol.* **134**: 1141-1156.
- Chilcott, G. S., K. T. Hughes. 2000.** Coupling of flagella gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 694-708.
- Chopra, A. K., C. W. Houston, J. W. Peterson, G. F. Jin. 1993.** Cloning, expression and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 513-523.
- Chopra, A. K., C. W. Houston. 1989.** Purification and partial characterization of a cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Can. J. Microbiol.* **35**: 719-727.
- Chopra, A. K., C. W. Houston. 1999.** Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microb. Infect.* **1**: 1129-1137.
- Chopra, A. K., J. W. Peterson, X. J. Xiu, D. H. Coppenhaver, C. W. Houston. 1996.** Molecular and biochemical characterization of a heat-labile cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog.* **21**: 357-377.

- Chopra, A. K., R. Pham, C. V. Houston. 1994.** Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*. *Gene*. **139**: 87-91.
- Chopra, A. K., T. N. Vo, C. W. Houston. 1992.** Mechanism of action of cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**: 15-19.
- Chu, S. S. Cavaignac, J. Feutrier, B. M. Phipps, M. Kostrzynska, W. W. Kay, T. J. Trust. 1991.** Structure of the tetragonal surface virulence array protein and gene of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **266**: 15258-65.
- Chuang, Y. C., S. F. Chiou, J. H. Su, M. L. Wu, M. C. Chang. 1997.** Molecular analysis and expression of the extracellular lipase of *Aeromonas hydrophila* MCC-2. *Microbiology* **143**: 803-812.
- Collighan, R. J., G. Coleman. 1995.** GenBank Accession No. X87995.
- Colwell, R. R., M. T. McDonell, J. De Ley. 1986.** Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 473-477.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*: 284: 1318-1322.
- Creuzenet, C., M. J. Schur, J. Li, W. W. Wakarchuk. 2000.** FlaA1, a new bifunctional UDP-GlcNAc C₆ dehydratase/C₄ reductase from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **275**: 34873-34880.
- Damas, D., D. Ledoux, M. Nys, Y. Vrindts, G. De Groote, G., P. Franchimont, L. Maurice. 1992.** Cytokine serum level during severe sepsis in human. IL-6 as a marker of severity. *Ann. Surg.* **215**: 356-362.
- Darveau, R. P., R. E. W. Hancock. 1983.** Procedure for the isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* **155**: 831- 838.
- De Lorenzo V., M. Herreo, U. Jakubkiz, K.N. Timmis. 1990.** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6568-6572
- Dean, G. E., R. M. Macnab, J. Stader, P. Matsumura, L. Burks. 1984.** Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane-associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 991-999.
- Ditta G., T. Schmidhauser, E. Yakobson, P. Lu, X-W. Liang, D.R. Finlay, D. Guiney, D.R. Helinski. 1985.** Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**: 149-153
- Doig, P., L. Emody, T. J. Trust. 1992.** Binding of laminin and fibronectin by the trypsin-resistant major structural domain of the crystalline virulence surface array protein of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **267**: 43-49.

- Doig, P., N. Kinsella, P. Guerry, T. J. Trust. 1996.** Characterisation of a post-translational modification of *Campylobacter* flagellin: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol. Microbiol.* **19**: 379-387.
- Doll, L., G. Frankel. 1993.** Cloning and sequencing of two new *fli* genes, the products of which are essential for *Salmonella* flagellar biosynthesis. *Gene.* **126**: 119-121.
- Dooley, J. S. G., R. Lallier, T. J. Trust. 1986.** Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **12**: 339-344.
- Dooley, J.S.G., H. Engelhardt, W. Baumeister, W. W. Kay, T. J. Trust. 1989.** Three dimensional structure of the surface layer from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* **171**: 190-197.
- Dooley, J.S.G., T. J. Trust. 1988.** Surface protein composition of *Aeromonas hydrophila* virulent for fish: identification of an S-layer protein. *J. Bacteriol.* **170**: 499-506.
- Dower J.W., J.F. Miller, C.W. Ragsdale. 1988.** High efficiency transformants of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Research.* **16**: 6127-6145
- Edwards, U., A. Muller, S. Hammerschmidt, R. Gerardy-Schahn, M. Frosch. 1994.** Molecular analysis of the biosynthetic pathway of the α -2,8 polysialic acid capsule by *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Mol. Microbiol.* **14**: 141-149.
- Eggset, G., R. Bjornsdottir, R. M. Leifson, J. A. Arnesen, D. H. Coucheron. 1994.** Extracellular glycerophospholipid-cholesterol acyl transferase from *Aeromonas salmonicida* activation by serine protease. *J. Fish Dis.* **17**:17-29.
- Ellis, A. E. 1997.** The extracellular toxins of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida*, p. 248-268. *In* E.-M. Bernoth, A. E. Ellis, P. J. Midtlyng, G. Olivier, and P. Smith (ed.), Furunculosis. Multidisciplinary fish disease research. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- Fairbanks, G., T. L. Sleck, D. W. Wallach. 1971.** Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochem.* **10**: 2606-2617.
- Ferguson, M. R. X. J. Xu, C. W. Houston, J. W. Peterson, D. H. Coppenhaver, V. L. Popov, A. K. Chopra. 1997.** Hyperproduction, purification and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **65**: 4299-4308.
- Finkelstein, R. A., C. V. Sciortino, M. A. McIntosh. 1983.** Role of iron in microbial-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **4**: 759-577.
- Francki, K. T., B. J. Chang. 1994.** Variable expression of O-antigen and the role of lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas sobria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**: 97-102.
- Fraser, G. M., C. Hughes. 1999.** Swarming motility. *Curr Opin Microbiol.* **2**: 630-635.
- Garrote, A., R. Bonet, S. Merino, M. D. Simon-Pujol, F. Congregado. 1992.** Occurrence of a capsule in *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**: 127-131.

Gavín, R., A. A. Rabaan, S. Merino, J. M. Tomás, I. Gryllos, J. G. Shaw. 2002. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **43**: 383-397.

Gerard, C. 1990. Purification of glycoproteins. *Meth. Enzymol.* **182**: 529-539.

Gray, D. I., R. G. Kroll. 1995. Polymerase chain reaction amplification of the *flaA* gene for the rapid identification of *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* **20**: 65-68.

Gryllos, I., J. G. Shaw, R. Gavín, S. Merino, J. M. Tomás. 2001. Role of *flm* locus in mesophilic *Aeromonas* species adherence. *Infect. Immun.* **69**: 65-74.

Gudmundsdóttir, S., B. Gudmundsdóttir. 2001. Induction of inflammatory cytokines by extracellular products and LPS of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* spp. *achromogenes* in mice and mouse cell cultures. *Vet. Immun. Immunopath.* **81**: 71-83.

Guerry, P., P. Doig, R. A. Alm, D. H. Burr, N. Kinsella, T. J. Trust. 1996. Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin. *Mol. Microbiol.* **19**: 369-378.

Hanahan, D. 1983. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hanninen, M. L. S. Salmi, L. Mattila, R. Taipainen, A. Siitonen. 1995. Association of *Aeromonas* spp. with travellers' diarrhoea in Finland. *J Med Microbiol.* **42**: 26-31.

Harshey, R. M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **13**: 389-394.

Herrero, M., V. De Lorenzo, K. N. Timmis. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 6557-6567.

Hiney, M., M. T. Dawson, D. M. Heery, P. R. Smith, F. Gannon, R. Powell. 1992. DNA probe for *Aeromonas salmonicida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1039-1042.

Hirono, I., T. Aoki, T. Asao, S. Kozaki. 1992. Nucleotide sequences and characterization of haemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Microb. Pathog.* **15**: 269-282.

Hirono, I., T. Aoki. 1993. Cloning and characterization of three hemolysin genes from *Aeromonas salmonicida*. *Microb. Pathog.* **15**: 269-282.

Ho, A. S. Y., T. A. Mietzner, A. J. Smith, G. K. Schoolnik. 1990. The pili of *Aeromonas hydrophila*: identification of an environmentally regulated "mini pilin." *J. Exp. Med.* **172**: 795-806.

Ho, K. C., G. N. Chang. 2000. The *fliU* and *fliB* genes are expressed as a single ORF in *Salmonella choleraesuis*. *Can. J. Microbiol.* **46**: 1149-1152.

- Hokama, A., M. Iwanaga. 1992.** Purification and characterization of *Aeromonas sobria* Ae24 pili: a possible new colonization factor. Microb. Pathog. **13**:325-334.
- Hokama, A., Y. Honma, N. Nakasone. 1990.** Pili of an *Aeromonas hydrophila* strain as a possible colonization factor. Microbiol. Immunol. **34**:901-915.
- Honma, Y., N. Nakasone. 1990.** Pili of *Aeromonas hydrophila*: purification, characterization, and biological role. Microbiol. Immunol. **34**:83-98.
- Howard, S. P., J. T. Buckley. 1985.** Activation of the hole-forming toxin aerolysin and extracellular processing. J. Bacteriol. **163**:336-340.
- Howard, S. P., J. T. Buckley. 1986.** Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the haemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. Mol. Gen. Genet. **204**: 289-295.
- Husslein, V., B. Huhle, T. Jarchau, R. Lurz, W. Goebel, T. Chakraborty. 1988.** Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *aerCaerA* region of *Aeromonas sobria* encoding aerolysin and its regulatory region. Mol. Microbiol. **2**: 507-517.
- Husslein, V., T. Chakraborty, A. Carnahan, S. W. Joseph. 1992.** Molecular studies on the aerolysin gene of *Aeromonas* species and discovery of a species-specific probe for *Aeromonas trota* species nova. Clin. Infect. Dis. **14**: 1061-1068.
- Ingham, A. B., J. M. Pemberton. 1995.** A lipase of *Aeromonas hydrophila* showing nonhemolytic phospholipase C activity. Curr. Microbiol. **31**:28-33.
- Ishiguro, E. E., W. W. Kay, T. Ainsworth, J. B. Chamberlain, J. T. Buckley, T. J. Trust. 1981.** Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature. J. Bacteriol. **148**: 333-340.
- Iwanaga, M., A. Hokama. 1992.** Characterization of *Aeromonas sobria* TAP13 pili: a possible new colonization factor. J. Gen. Microbiol. **138**: 1913-1919.
- Janda, J. M. 1991.** Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin. Microbiol. Rev. **4**: 397-410.
- Janda, J. M., L. S. Guthertz, R. P. Kokka, T. Shimada. 1994.** *Aeromonas* species in septicemia: laboratory characteristics and clinical observations. Clin. Infect. Dis. **19**:77-83.
- Janda, J. M., S. L. Abbott, S. Kashe, G. H. Kellogg, T. Shimada. 1996.** Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. J. Clin. Microbiol. **34**: 1930-1933.
- Janda, J. M., S. L. Abbott. 1998.** Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. Clin. Infect. Dis. **27**: 332-344.

Janda, J.M., S.L. Abbott, and A.M. Carnahan 1995. *Aeromonas* and *Plesiomonas* p. 477-482. In Manual of Clinical Microbiology 6th ed.). Murray, P.M., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., and Tenover, R.H. (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Jaques, S., Y. K. Kim, L. L. McCarter. 2000. Components of the polar flagellar switch complex and assembly apparatus. Presentado.

Kaniga, K., I. Delor, G. R. Cornelis. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.

Kawagishi, I., M. Homma, A. W. Williams, R. M. Macnab. 1996. Characterization of the flagellar hook length control protein FliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 2954-2959.

Kawagishi, I., V. Mueller, A. W. Williams, V. M. Irikura, R. M. Macnab. 1992. Subdivision of flagellar region III of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromosomes and identification of two additional flagellar genes. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1051-1065.

Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* **70**: 191-197.

Kirov S.M. 1997. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Doyle, Benchat, Motville. ASM Press

Kirov, S. M. 1993. Adhesion and piliation of *Aeromonas* spp., *Med. Microbiol. Lett.* **2**: 274-280.

Kirov, S. M., B. C. Tassel, A. B. T. Semmler, L. A. O'Donovan, A. A. Rabaan, J. G. Shaw. 2002. Lateral flagella and swarming motility in *Aeromonas* species. *J. Bacteriol.* **184**: 547-555.

Kirov, S. M., I. Jacobs, L. J. Hayward, R. Hapin. 1995a. Electron microscopic examination of factors influencing the expression of filamentous surface structures on clinical and environmental isolates of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Microbiol. Immunol.* **39**:329-338.

Kirov, S. M., K. Sanderson. 1996. Characterization of a type IV bundle-forming pilus (BFP) from a gastroenteritis-associated strain of *Aeromonas veronii* biovar *sobria*. *Microb. Pathog.* **21**:23-34.

Kirov, S. M., L. A. O'Donovan, K. Sanderson. 1999. Functional characterization of type IV pili expressed on diarrhea-associated isolates of *Aeromonas* species. *Infect. Immun.* **67**: 5447-5454.

Kirov, S. M., L. J. Hayward, M. A. Nerrie. 1995b. Adhesion of *Aeromonas* sp. to cell lines used as models for intestinal adhesion. *Epidemiol. Infect.* **115**:465-473.

- Kokka, R. P., N. A. Vedros, J. M. Janda. 1990.** Electrophoretic analysis of the surface components of autoagglutinating surface array protein-negative *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. J. Clin. Microbiol. **28**: 2240-2247.
- Kokka, R.P., N. A. Vedros, J. M. Janda. 1992.** Immunochemical analysis and possible biological role of an *Aeromonas hydrophila* surface array protein in septicemia. J. Gen. Microbiol. **138**: 1229-1236.
- Konopka, K., J. B. Neilands. 1984.** Effect of serum albumin on siderophore-mediated utilization of transferrin iron. Biochemistry. **23**: 2122-2127.
- Kostrzynska, M., J. S. C. Dooley, T. Shimojo, T. Sakata, T. J. Trust. 1992.** Antigenic diversity of S-layer proteins from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. J. Bacteriol. **194**: 40-47.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Alberti, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin et al. 1997.** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. **390**: 249-256.
- Kyte and Doolittle. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
- Lanois, A., A. Givaudan. 1998.** GenBank Accession No. AJ131736.
- Lecrerc, G., S. P. Wang, B. Ely. 1998** A new class of *Caulobacter crescentus* flagellar genes. J. Bacteriol. **180**: 5010-5019.
- Leung, K. Y., R. M. Stevenson. 1988.** Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. J. Gen. Microbiol. **134**: 151-160.
- Lewis, K. 1986.** Anomalous mobilities of DNA restriction fragments on polyacrilamide gels. Promega. Notes. **6**: 4-5.
- Lin, C. S., S. H. Cheng. 1998.** *Aeromonas hydrophila* sepsis presenting as meningitis and necrotizing fascitis in a man with alcoholic liver cirrhosis. J. Formos. Med. Assoc. **97**:498-502.
- Linton, D., A. V. Karlyshev, P. G. Hitchen, H. R. Morris, A. Dell, N. A. Gregson, B. W. Wren. 2000.** Multiple n-acetyl neuraminic acid synthetase (*neuB*) genes in *Campylobacter jejuni*: identification and characterization of the gene involved in sialylation of lipo-oligosaccharide. Mol. Microbiol. **35**: 1120-1134.
- Ljungh, Å., P. Enroth, T. Wadström. 1982.** Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. Toxicon. **20**: 787-794.

Ljungh, A., T. Wadstrom. 1983. Toxins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. J. Toxicol. Toxin. Rev. **1**: 257-307.

Lovgren, A., M. Y. Zhang, A. Engstrom, R. Landen. 1993. Identification of two expressed flagellin genes in the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*. J. Gen. Microbiol. **139**: 21-30

Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility. In: Neidhardt FC, Ingraham J, Low KB *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, pp. 123-145. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Maniatis T., E.F. Ritsch, J. Sabrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.

Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. J. Mol. Biol. **3**: 208-218

Martínez, E., F. De la Cruz. 1988. Transposon Tn21 encodes RecA⁻ independent site-specific integration system. Mol and Gen. Genetics. **211**: 320-335.

Martinez, M. J., D. S. Pujol, F. Congregado, S. Merino, X. Rubires, J. M. Tomás. 1995. The presence of capsular polysaccharide in mesophilic *Aeromonas hydrophila* serotypes O:11 and O:34. FEMS Microbiol. Lett. **128**: 69-74.

Massad, G., J. E. L. Arceneaux, B. R. Byers. 1991. Acquisition of iron from host sources by mesophilic *Aeromonas* species. J. Gen. Microbiol. **137**: 237-241.

Massad, G., J. E. L. Arceneaux, B. R. Byers. 1994. Diversity of siderophore genes encoding biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Aeromonas* spp. Bio. Metals. **7**: 227-236.

McCarter, L. L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**: 445- 462.

McCarter, L. L., M. E. Wright. 1993. Identification of genes encoding components of the swarmer cell flagellar motor and propeller and a sigma factor controlling differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. **175**: 3361-3371.

McCarter, L. L., M. Hillmen, M. Silverman. 1988. Flagellar dynamometer control swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. Cell. **54**: 345-351.

McCarter, L. L., M. Silverman. 1990. Surface-induced swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. Mol. Microbiol. **4**: 1057-1062.

McIntosh, D., B. Austin. 1991. Atypical characteristics of the salmonid pathogen *Aeromonas salmonicida*. J. Gen. Microbiol. **137**: 1341-1343.

Merino S., A. Aguilar, J. Tomás, R. Bonet, M.J Martínez, D. Simón-Pujol, F. Congregado. 1997b. Complement resistance of capsulated strains of *Aeromonas salmonicida*. Microbial Pathogenesis **22**: 315-320

Merino S., A. Aguilar, X. Rubires, N. Abitiu, M. Regué, J. Tomás. 1997a. The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 in the adherence to and invasion of fish cell lines. *Res. Microbiol.* **148**: 625-631

Merino S., A. Aguilar, X. Rubires, D. Simón-Pujol, F. Congregado, J. Tomás. 1996c. The role of the capsular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* in the adherence and invasion of fish cell lines. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**:185-189

Merino S., X. Rubires, A. Aguilar, J. Tomás. 1996a. The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 97-101.

Merino S., X. Rubires, A. Aguilar, J.F. Guillot, J. Tomás. 1996b. The role of the O-antigen lipopolysaccharide on the colonization *in vivo* of the germfree chicken gut by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34. *Microb. Path.* **20**: 325-333

Merino, S. A. Aguilar, X. Rubires, J. M. Tomás. 1998. Mesophilic *Aeromonas* strains serogroups: the influence of growth and osmolarity on lipopolysaccharide and virulence. *Res. Microbiol.* **149**: 407-416.

Merino, S., A. Aguilar, M. M. Noguerras, M. Regué, S. Swift, J. M. Tomás. 1999. Cloning, sequencing and role in virulence of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas* sp. serogroup O:34. *Infect. Immun.* **67**: 4008-4013.

Merino, S., S. Camprubí J. M. Tomás. 1992. Effect of growth temperature on outer membrane componenets and virulence of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *Infect. Immun.* **60**: 4343-4349.

Merino, S., S. Camprubí, J. M. Tomás. 1990. Isolation and characterization of bacteriophage PM3 from *Aeromonas hydrophila*, the bacterial receptor for which is the monopolar flagellum. *FEMS Microbiol. Lett.* **69**: 277-282.

Merino, S., S. Camprubí, J. M. Tomás. 1991. The role of lipopolysaccharide in complement-killing of *Aeromonas hydrophila* strains of serotype O:34. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 1583-1590.

Merino, S., S. Camprubí, J. T. Tomás. 1993. Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 149-154.

Merino, S., X. Rubires, A. Aguilar, J. M. Tomás. 1997c. The role of flagella and motility in the adherence and invasion to fish cell lines by *Aeromonas hydrophila* serogroup O:34 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 213-217.

Merino, S., X. Rubires, S. Kønchel, J. M. Tomás. 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. J. Food. Microbiol.* **28**: 157-168.

Messner, P., U. B. Sleytr. 1992. Crystalline bacterial cell-surface layers. In: *Advances in Microbial Physiology* (Rose, A.H. and Tempest, D.W., Eds.), pp. 213-275. Academic Press, London.

Metcalf, W. W., W. Jiang, B. L. Wanner. 1994. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K γ origin plasmids at different copy numbers. *Gene* **138**: 1-7

Mikuiskis, A. V., I. Devor, V. H. Thi G. R. Cornellis. 1994. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.* **14**: 905-915.

Miller, V.L., J. J. Mekalanos. 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* **170**: 2575-2583.

Miyake, M., K. Iga, C. Izumi, A. Miyagawa, Y. Kobashi, T. Konishi. 2000. Rapidly progressive pneumonia due to *Aeromonas hydrophila* shortly after near-drowning. *Intern. Med.* **39**: 1128-1130.

Moens, S., K. Michiels, F. Vanderleyden. 1995b. Glycosilation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium. *Microbiology.* **141**: 2651-2657.

Moens, S., K. Michiels, V. Keijers, F. Van Leuven, F. Vanderleyden. 1995a. Cloning, sequencing and phenotypic analysis of *lafA1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* **177**: 5419-5426.

Moens, S., M. Schlöter, F. Vanderleyden. 1996. Expression of the structural gene *lafA1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. *J. Bacteriol.* **178**: 5017-5019.

Morrison, D. 1983. Bacterial endotoxins and pathogenesis. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 733-747.

Munn, C.B., E. E. Ishiguro, W. W. Kay, T. J. Trust. 1982. Role of surface components in serum resistance of virulent *Aeromonas salmonicida*. *Infect. Immun.* **36**: 1069-1075.

Namdari, H., E. J. Bottone. 1990. Microbiologic and clinical evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as pediatric enteric pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 837-840.

Namdari, H., E. J. Bottone. 1991. *Aeromonas caviae*: ecologic adaptation in the intestinal tract of infants coupled to adherence and enterotoxin production as factors in enteropathogenicity. *Experientia.* **47**: 432-436.

Neves, M. S., M. P. Nunes, A. M. Milhomen. 1994. *Aeromonas* species exhibit aggregative adherence to HEP-2 cells. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1130-1131.

Nguyen, C. C., M. H. Saier, Jr. 1996. Structural and phylogenetic analysis of the MotA and MotB families of bacterial flagellar motors proteins. *Res. Microbiol.* **147**: 317-332.

Noonan, B., T. J. Trust. 1995a. Molecular analysis of an A-protein secretion mutant of *Aeromonas salmonicida* reveals a surface layer-specific protein secretion pathway. *J. Mol. Biol.* **248**: 316-327.

- Noonan, B., T. J. Trust. 1995b. Molecular characterization of an *Aeromonas salmonicida* mutant with altered surface morphology and increased systemic virulence. *Mol. Microbiol.* **15**: 65-75.
- Noonan, B., T. J. Trust. 1996. An *Aeromonas salmonicida* gene required for the establishment of infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* **175**: 127-131.
- Ottemann, K. M., J. F. Miller. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol. Microbiol.* **24**: 1109-1117.
- Oyofe, B. A., D. M. Rollins. 1993. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4090-4095.
- Ozenberger, B. A., T. J. Brickman, M. A. McIntosh. 1989. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* isochorismate synthetase gene *entC* and evolutionary relationship of isochorismate synthetase and other chorismate-utilizing enzymes. *J. Bacteriol.* **171**: 775-783.
- Parker, C. T., A. W. Kloser, C. A. Schnaitman, M. A. Stein, S. Gottesman, B. W. Gibson. 1992. Role of *rfaG* and *rfaP* genes in determining the lipopolysaccharide core structure and cell surface properties of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**: 2525-2538.
- Parkhill, J., B. W. Wren, K. Mungall, J. M. Ketley, C. Churchw, D. Basham, T. Chillingworth, R. M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, K. Jagels, A. Karlyshev, S. Moule, M. J. Pallen, P. W. Penn, M. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, A. VanVliet, S. Whitehead, B. G. Barrell. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature*. **403**: 665-668.
- Pearson, W. R., D. J. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 2444-8.
- Pemberton, J. M., S. P. Kidd, R. Schmidt. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 1-10.
- Pepe, C. M., M. W. Eklund, M. S. Strom. 1996. Cloning of an *Aeromonas hydrophila* type IV pilus biogenesis gene cluster: complementation of pilus assembly functions and characterization of a type IV leader peptidase/N-methyltransferase required for extracellular protein secretion. *Mol. Microbiol.* **194**:857-869.
- Phipps, B. M., W. W. Kay. 1988. Immunoglobulin binding by the regular surface array of *Aeromonas salmonicida*. *J. Biol. Chem.* **263**: 9298-9303.
- Picken, R. N. 1992. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequence for specific detection of the agents of Lyme disease and North American fever. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 99-114.
- Potomski, J., V. Burke, J. Robinson, D. Fumarola, G. Miragliotta. 1987. *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross-reactive with cholerae toxin. *J. Med. Microbiol.* **23**: 179-186.

Pradel, E., C. Schnaitman. 1991. Effect of the *rfaH* (*sfrB*) and temperature on the expression of the *rfa* genes of *Escherichia coli* K12. J. Bacteriol. **173**: 6428-6431.

Pratt, L.A., Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. **30**: 285-293.

Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein. 1999. Microbiología. p: 60-64. 4ªed. McGraw Hill. Interamericana de España.

Prüß, B. M., P. Matsumura. 1997. Cell cycle regulation of flagellar genes. J. Bacteriol. **179**: 5602-5604.

Quinn, D. M., H. M. Atkinson, A. H. Bretag, M. Tester, T. J. Trust, C. Y. F. Wong, R. L. P. Flower. 1994. Carbohydrate-reactive, pore-forming outer membrane proteins of *Aeromonas hydrophila*. Infect. Immun. **62**: 4054-4058.

Rabaan, A. A., I. Gryllos, J. M. Tomás, J. G. Shaw. 2001. Motility and the polar flagellum are required for *Aeromonas caviae* adherence to HEp-2 cells. Infect. Immun. **69**: 4257-4267.

Rasmussen, H. N., J. E. Olsen, K. Jorgensen, O. F. Rasmussen. 1996. Detection of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli* in chicken faecal samples by PCR. Lett. Appl. Microbiol. **23**: 363-366.

Reeves, P. R., M. Hobbs, M. A. Valvano, M. Skurnik, C. Whitfield, D. Coplin, N. Kido, J. Klena, D. Maskell, C. R. H. Raetz, P. D. Rick. 1996. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. Trends Microbiol. **4**: 495-503.

Rigget, G. P., B. Barrett, I. S. Roberts. 1998. The localization of KpsC, S, and T and KfiA, C, and D proteins involved in the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex. Microbiology. **144**: 2905-2914.

Rivero, O., J. Anguita, C. Paniagua, G. Naharro. 1990. Molecular cloning and characterization of an extracellular protease gene from *Aeromonas hydrophila*. J. Bacteriol. **172**:3905-3908.

Rivero, O., J. Anguita, D. Mateos, C. Paniagua, G. Naharro. 1991. Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serine protease gene from *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiol. Lett. **81**:1-8.

Rossolini, G. M., T. Walsh, G. Amicosante. 1996. The *Aeromonas* metallo-beta-lactamase-genetics, enzymology and contribution to drug resistance. Microb. Drug. Resist. Mech. Epidemiol. Dis. **2**: 245-252.

Rubires, X., F. Saigi., N. Piqué., N. Climent., S. Merino., S. Alberti., J. M. Tomás., M. Regué. 1997. A gene (*wbbL*) from *Serratia marcescens* N28b (O4) complements the *rfb*-50 mutation of *Escherichia coli* K-12 derivatives. J. Bacteriol. **179**: 7581-7586.

- Rubires, X., S. Merino, A. Aguilar, M. M. Nogueras, J. M. Tomás. 1998. Isolation of three different bacteriophage from mesophilic *Aeromonas* sp. That use different types of monopolar flagella as their primary receptor. FEMS Microbiol. Lett. **161**: 53-57.
- Sakazaki R., T. Shimada. 1984. O-serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **37**: 247-255
- Samatey, F. A., K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, K. Namba. 2001. Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch supercoiling. Nature. **410**: 331-337.
- Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schnaitman, C. A., J. D. Klena. 1993. Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. Microbiol. Rev. **57**:655-682.
- Segura, A., E. Duque, J. L. Ramos. 1999. Putative flagellar biosynthetic protein FliP and FliR. Presentado.
- Senapin, S., U. Chaisri, S. Panyim, S. Tungpradebkul. 1998. A new type of flagellin gene in *Pseudomonas putida*. Presentado.
- Shaw, D. H., M. J. Squire. 1984. O-antigen structure in a virulent strain of *Aeromonas hydrophila*. FEMS Microbiol. Lett. **24**: 277-280.
- Shaw, J. G., J. P. Thornley, I. Palmer, I. Geary. 1995. Invasion of tissue culture cells by *Aeromonas caviae*. Med. Microbiol. Lett. **4**: 324-331.
- Shieh, H. S. 1987. Protection of atlantic salmon against motile aeromonads septicaemia with *Aeromonas hydrophila* protease. Microbios. Lett. **36**: 133-138.
- Shimada, T., R. Sakazaki, K. Suzuki. 1985. Peritrichous flagella in mesophilic strains of *Aeromonas*. Jpn. J. Med. Sci. Biol. **38**: 141-145.
- Simon, R., U. Priefer, A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio.Technology* **1**: 784-791.
- Slocum, M. K., J. S. Parkinson. 1983. Genetics of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli*: organization of the tar region. J. Bacteriol. **155**: 565-577.
- Stader, J., P. Matsumura, D. Vacarte, G. E. Dean, R. M. Macnab. 1986. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *motB* gene and site limited incorporation of its product into the cytoplasmic membrane. J. Bacteriol. **166**: 244-252.
- Starnbach, M. N., S. Lory. 1992. The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative σ factor required for flagellar synthesis. Mol. Microbiol. **6**: 459-469.

Stintzi, A., C. Barnes, J. Xu, K. N. Raymond. 2000. Microbial iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm. *PNAS*. **97**: 10691-10696.

Stintzi, A., K. N. Raymond. 2000. Amonabactin-mediated iron acquisition from transferring and lactoferrin by *Aeromonas hydrophila*: direct measurement of individual microscopic rate constants. *JBIC*. **5**: 57-66.

Stover, C. K., X.-Q. T. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizaguchi, P. Warrenner. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**: 959-964.

Szymanski, C. M., R. Yao, C. P. Ewing, T. J. Trust, P. Guerry. 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **35**: 1022-1030.

Thomas, L. V., R. J. Gross, T. Cheasty, B. Rowe. 1990. Extended serogrouping scheme for motile, mesophilic *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.* **28**:980-984.

Thomas, S.R., T. J. Trust. 1995a. Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene. *J. Mol. Biol.* **245**: 568-581.

Thomas, S.R., T. J. Trust. 1995b. A specific PulD homolog is required for the secretion of paracrystalline surface array subunits in *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **177**: 3932-3939.

Thornley, J. P., J. G. Shaw, I. A. Gryllos, A. Eley. 1995. Cell line adhesion and haemagglutination of *Aeromonas caviae* clinical isolates. *Med. Microbiol. Lett.* **4**: 316-323.

Thornley, J. P., J. G. Shaw, I. A. Gryllos, A. Eley. 1996. Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines HEp-2 and Caco-2. *J. Med. Microbiol.* **45**: 445-451.

Thornley, J. P., J. G. Shaw, I. A. Gryllos, A. Eley. 1997. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species. *Rev. Med. Microbiol.* **8**: 61-72

Thornton, J., S. P. Howard, J. T. Buckley. 1988. Molecular cloning of a phospholipid-cholesterol acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. Sequence homologies with lecithin-cholesterol acyltransferases and other lipases. *Biochim. Biophys. Acta.* **959**: 153-159.

Thornton, J.C., R. A. Gardu-o, S. G. Newman, W. W. Kay. 1991. Surface-disorganized, attenuated mutants of *Aeromonas salmonicida* as furunculosis live vaccines. *Microb. Pathogen.* **11**: 85-99.

Titball, R. W. 1993. Bacterial phospholipases C. *Microbiol. Rev.* **57**:347-366.

Togashi, F. S. Yamaguchi, M. Kihara. 1997. An extreme clockwise switch bias mutation in *fliG* of *Salmonella typhimurium* and its suppression by slow-motile mutations in *motA* and *motB*. *J. Bacteriol.* **179**: 2994-3003.

Tomb, J. -F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.

G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**: 359-547.

Totten, P. A., S. Lory. 1990. Characterization of the type a flagellin gene from *Pseudomonas aeruginosa* PAK. *J. Bacteriol.* **172**: 7188-7199.

Trust, T. J., P. S. Howard, J. B. Chamberlain, E. E. Ishiguro, J. T. Buckley. 1980. Additional surface protein in autoaggregating strains of atypical *Aeromonas salmonicida*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **9**: 35-38.

Trust, T. J., W. W. Kay, E. E. Ishiguro. 1983. Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.* **9**: 315-318.

Trust, T.J. 1993. Molecular, structural and functional properties of *Aeromonas* S-layers. In: *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers*. (Beveridge, T.J. and Koval, S.F., Eds.), pp. 159-171. Plenum Publishing Corporation, New York.

Tsai, C. M., C. E. Frasch. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.

Tso, M. D., J. S. G. Dooley. 1995. Temperature-dependent protein and lipopolysaccharide expression in clinical *Aeromonas* isolates. *J. Med. Microbiol.* **42**: 32-38.

Umelo, E., T. J. Trust. 1997. Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from *Aeromonas salmonicida* A449. *J. Bacteriol.* **179**: 5292-5299.

Van der Goot, F. G., F. Pattus, M. Parker, T. J. Buckley. 1994. The cytolytic toxin aerolysin: from the soluble form to the transmembrane channel. *Toxicology.* **87**: 19-28.

Way, J. S., K. L. Josephson, S. D. Pillai, M. Abbaszadegan, C. P. Gerba, I. L. Pepper. 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1473-1479.

Weinberg, E. D. 1974. Iron and susceptibility to infections disease. *Science* **184**: 952-956.

Whitby, P. W., M. Laudon, G. Coleman. 1992. The cloning and nucleotide sequence of the serine protease gene (*aspA*) of *Aeromonas salmonicida*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **78**: 65-71.

Wilcox, M.H., A. M. Cook, A. R. Eley, R. C. Spencer. 1992. *Aeromonas* spp. as a potential cause of diarrhoea in children. *J. Clin. Pathol.* **45**: 959-963.

Winstanley, C., A.W. Morgan. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiol.* **143**: 3071-3084.

Yokoseki, T., K. Kutsukake, K. Ohnishi, T. Lino. 1995. Functional analysis of the flagellar genes in the *FliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiol.* **141**: 1715-1722.

Zapata, G., W. F. Vann, W. Aaronson, M. S. Lewis, M. Moos. 1989. Sequence of the cloned *Escherichia coli* K1 CMP-*N*-acetylneuraminic acid synthetase. J. Biol. Chem. **264**: 14769-14774.

Zhang, Y. L., E. Arakawa, K. Y. Leung. 2002. Novel *Aeromonas hydrophila* PPD134/91 genes involved in O-antigen and capsule biosynthesis. Infect. Immun. **70**: 2326-2335.

Zupacnic, T. J., D. A. Hilt, C. D. Zarley, P. C. Kimball. 1988. Analysis and purification of synthetic DNA fragments with NuSieve agarosa mini-gels. Bio. Techniques. **6**: 297-298.

Zywno, S. R., C. Bailey, J. Arceneaux, R. Byers. 1989. Siderophore distribution in isolates of the *Aeromonas* species, abstr. D-91, p. 97. Abstr. 89th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Zywno, S. R., J. E. L. Arceneaux, M. Altwegg, B. R. Byers. 1992. Siderophore production and DNA hybridisation groups of *Aeromonas* spp. J. Clin. Microbiol. **30**: 619-622.